

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Análisis de los cromosomas mitóticos de cuatro especies de anuros de la familia

Centrolenidae

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas

SANTIAGO ANDRÉS GARCÍA ITURRALDE

Quito, 2013

DEDICATORIA

A mi padre

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Miryan Rivera por dirigir la presente disertación, por su paciencia, sensatez y dedicación; además a Ailín Blasco por su conocimiento, enseñanza y guía; personas que ayudaron al correcto desenvolvimiento del presente trabajo.

A mi madre por sus valiosas enseñanzas impartidas desde mi niñez, a mi padre por ser ejemplo de tenacidad y trabajo, a mis hermanos por su compañía, su buen ánimo y su apoyo constante en la realización de esta disertación, además de mi tía que ha permanecido a mi lado y a mi familia en general por toda la ayuda prestada en las etapas de mi vida y en especial en esta etapa universitaria.

A los miembros del Laboratorio de Investigaciones de Cromosomas y Biomoléculas de Anfibios de la PUCE, en especial a, Elizabeth Vásquez, Mónica Reinoso, Andrea Vargas y Verónica Andrade.

Al Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (QCAZ) y a la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) por el financiamiento del proyecto “Inventario y caracterización Genética y Morfológica de la Diversidad de Anfibios, Reptiles y Aves de los Andes del Ecuador”.

A Aleket Gómez.

A mis amigos Carlos Carvajal, Daniel Cajas, Paola Mafla, Juan Pablo Almeida y Gabriela Valenzuela.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Y a todas las personas que de una o otra manera estuvieron relacionadas en la presente investigación.

A todos GRACIAS.

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
TABLA DE CONTENIDOS	VI
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABLAS	X
LISTA DE ANEXOS	XI
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	12
3.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO	14
4.1.1. ESPECÍMENES	14
4.1.2. COLECTA	14
4.1.3. MANTENIMIENTO	14
4.2. PROCESAMIENTO DE INDIVIDUOS	15
4.2.1. PREPARACIÓN DEL DUODENO	15
4.2.2. PROCESAMIENTO DEL TEJIDO	15
4.3. PREPARADOS CROMOSÓMICOS	16
4.3.1. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN CELULAR	16

4.3.1. GOTEÓ DE LA SUSPENSIÓN CELULAR	16
4.4. TRATAMIENTO PARA CROMOSOMAS FIJADOS EN LAS PLACAS ..	17
4.4.1. TINCIÓN CON GIEMSA	17
4.5. BANDEO CROMOSÓMICO	17
4.5.1. BANDEO NOR (REGIÓN DEL ORGANIZADOR NUCLEOLAR)	17
4.6. CARIOTIPAJE	17
4.6.1. REVISIÓN DE PLACAS	17
4.6.2. OBTENCIÓN DE IMÁGENES	18
4.6.3. ELABORACIÓN DE CARIOTIPOS E IDEOGRAMAS	18
4.6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
5. RESULTADOS	20
5.1. DESCRIPCIÓN DE LOS CROMOSOMAS MITÓTICOS	20
5.2. DESCRIPCIÓN DE LOS CROMOSOMAS MITÓTICOS DE <i>Nymphargus grandisonae</i>	20
5.2.1. MORFOLOGÍA DE LOS CROMOSOMAS MITÓTICOS DE <i>Nymphargus grandisonae</i>	21
5.2.2. DESCRIPCIÓN DE LAS BANDAS NOR EN <i>Nymphargus grandisonae</i>	21
5.3. DESCRIPCIÓN DE LOS CROMOSOMAS MITÓTICOS DE <i>Hyalinobatrachium aureoguttatum</i>	21
5.3.1. MORFOLOGÍA DE LOS CROMOSOMAS MITÓTICOS DE <i>Hyalinobatrachium aureoguttatum</i>	21
5.3.2. DESCRIPCIÓN DE LAS BANDAS NOR EN <i>Hyalinobatrachium aureoguttatum</i>	22

5.4. DESCRIPCIÓN DE LOS CROMOSOMAS MITÓTICOS DE <i>Teratohyla pulverata</i>	22
5.4.1. MORFOLOGÍA DE LOS CROMOSOMAS MITÓTICOS DE <i>Teratohyla pulverata</i>	22
5.4.2. DESCRIPCIÓN DE LAS BANDAS NOR EN <i>Teratohyla pulverata</i> ...	23
5.5. DESCRIPCIÓN DE LOS CROMOSOMAS MITÓTICOS DE <i>Teratohyla spinosa</i>	23
5.5.1. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE <i>Teratohyla spinosa</i>	23
5.5.2. DESCRIPCIÓN DE LAS BANDAS NOR EN <i>Teratohyla spinosa</i> ...	23
5.6. LONGITUDES RELATIVAS	24
5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
6. DISCUSIÓN	25
7. CONCLUSIONES	32
8. RECOMENDACIONES	34
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
10. FIGURAS	42
11. TABLAS	49
12. ANEXOS	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución: a) Familia Centrolenidae y Allophrynidae b) Género <i>Nymphargus</i> c) Género <i>Hyalinobatrachium</i> d) Género <i>Teratohyla</i>	42
Figura 2. Especies de Centrolenidae analizadas: a) <i>Nymphargus grandisonae</i> b) <i>Hyalinobatrachium aureoguttatum</i> c) <i>Teratohyla pulverata</i> d) <i>Teratohyla spinosa</i>	43
Figura 3. Diagrama de cajas de <i>Teratohyla pulverata</i>	44
Figura 4. Diagrama de cajas de <i>Teratohyla spinosa</i>	44
Figura 5. <i>Nymphargus grandisonae</i> . a) Cariotipo en el que se incluye la morfología cromosómica; b) Ideograma de los pares cromosómicos (el par blanco posee el NOR y los óvalos la ubicación); c) Pareja y ubicación de la banda NOR.....	45
Figura 6. <i>Hyalinobatrachium aureoguttatum</i> . a) Cariotipo en el que se incluye la morfología cromosómica; b) Ideograma de los pares cromosómicos (el par blanco posee el NOR y los óvalos la ubicación); c) Pareja y ubicación de la banda NOR.....	46
Figura 7. <i>Teratohyla pulverata</i> . a) Cariotipo en el que se incluye la morfología cromosómica; b) Ideograma de los pares cromosómicos (el par blanco posee el NOR y los óvalos la ubicación); c) Pareja y ubicación de la banda NOR.....	47
Figura 8. <i>Teratohyla spinosa</i> . a) Cariotipo en el que se incluye la morfología cromosómica; b) Ideograma de los pares cromosómicos (el par blanco posee el NOR y los óvalos la ubicación); c) Pareja y ubicación de la banda NOR.....	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Número de serie, sexo y localidad de los especímenes de la familia Centrolenidae colectados para la investigación.	49
Tabla 2. Prueba de muestras independientes para <i>Nymphargus grandisonae</i> ...	50
Tabla 3. ANOVA de un factor para <i>Hyalinobatrachium aureoguttatum</i>	50
Tabla 4. Valores promedio de las longitudes relativas y desviaciones estándar de los cromosomas mitóticos de cuatro especies de centrolenidos.....	51
Tabla 5. Prueba de homogeneidad de varianzas para <i>Nymphargus grandisonae</i>	52
Tabla 6. Prueba de homogeneidad de varianzas para <i>Hyalinobatrachium aureoguttatum</i>	52
Tabla 7. Comparación de la morfología de los cromosomas mitóticos de cinco especies de Centrolenidae	53

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Fórmulas para obtener LR, RC, IC.	54
Anexo 2: Datos cromosómicos de <i>Nymphargus grandisone</i>	54
Anexo 3: Datos cromosómicos de <i>Hyalinobatrachium aureguttatum</i>	55
Anexo 4: Datos cromosómicos de <i>Teratohyla pulverata</i>	55
Anexo 5: Datos cromosómicos de <i>Teratohyla spinosa</i>	56
Anexo 6: Foto de la filogenia de la familia Centrolenidae.	57
Anexo 7: Foto de los cromosomas de <i>Vitreorana antisthenesi</i>	58

1. RESUMEN

Los centrolénidos son uno de los grupos más interesantes de anuros tanto por su morfología como por sus características ecológicas. Poseen el cuerpo de color verde limón y en general tienen la piel ventral transparente lo que permite ver órganos internos tales como corazón, hígado y tracto digestivo. Considerando los escasos análisis cromosómicos de especies de Centrolenidae, se plantea la presente investigación que se centra en la descripción del cariotipo representativo de cuatro especies de ranas de cristal (Anura: Centrolenidae): *Nymphargus grandisonae*, *Hyalinobatrachium aureoguttatum*, *Teratohyla spinosa* y *Teratohyla pulverata*. Se incluye la caracterización del número y morfología de los cromosomas mitóticos de las especies mencionadas, la distribución de la región del organizador nucleolar (NOR) y la descripción de similitudes y diferencias entre los cariotipos de los centrolénidos analizados. Para ello, se realizaron suspensiones celulares a partir de las microvellocidades duodenales y se realizaron tinciones convencionales con Giemsa. La región del organizador nucleolar (NOR) se determinó a través del bandeo con nitrato de plata. Entre los resultados se destacan que las cuatro especies de Centrolenidae: *Nymphargus grandisonae*, *Hyalinobatrachium aureoguttatum*, *Teratohyla spinosa*, *Teratohyla pulverata* poseen el mismo número cromosómico de 20 en condición diploide. Además se diferencian dos grupos cromosómicos: el primero, grupo A, conformado por ocho pares grandes y el grupo B, por dos pares pequeños. En cuanto al NOR: en *Nymphargus grandisonae*, *Hyalinobatrachium aureoguttatum* y *Teratohyla pulverata* se localizó en el par 9, mientras que en *Teratohyla spinosa*

en el par 2. Además se detectó la posible existencia de cromosomas sexuales en *Teratohyla pulverata* y una posible translocación de un fragmento cromosómico del par 1 al par 9 en *Hyalinobatrachium aureoguttatum*. En conclusión, los cromosomas de estas cuatro especies son altamente conservados pues todas ellas poseen un número cromosómico de $2n = 20$, y la morfología de sus cromosomas fluctúa entre cromosomas metacéntricos y submetacéntricos.

Palabras clave: Cariotipo, Centrolenidae, Citogenética, Cromosoma, NOR.

2. ABSTRACT

The centrolenids are one of the most interesting groups in amphibian because of their morphology and ecological characteristics. Their body is light green and in general his ventral skin is transparent, it let us observe internal organs like heart, liver and digestive tract. Considering the few chromosomal analysis Centrolenidae species raises the present research focuses on representative karyotype description of four glassfrogs karyotypes (Anura: Centrolenidae): *Nymphargus grandisonae*, *Hyalinobatrachium aureoguttatum*, *Teratohyla spinosa* y *Teratohyla pulverata*. This includes the characterization of the number and morphology of mitotic chromosomes of the species mentioned, the distribution of nucleolar organizer region (NOR) and description of similarities and differences between the karyotypes of centrolenid analyzed. To do this, cell suspensions were made from the microvilli duodenal conventional stains were performed with Giemsa. The nucleolar organizer region (NOR) was determined through banding with silver nitrate. The results highlighted that the four species of Centrolenidae: *Nymphargus grandisonae*, *Hyalinobatrachium aureoguttatum*, *Teratohyla spinosa*, *Teratohyla pulverata* have the same chromosome number of 20 diploid. In addition there are two different chromosomal groups: the first group A, consisting of eight pairs large and group B, by two small pairs. As for the NOR: in *Nymphargus grandisonae*, *Hyalinobatrachium pulverata* *Teratohyla aureoguttatum* and the pair were located at 9, while in *Teratohyla spinosa* in pair 2. Detected besides the possible existence of sex chromosomes in *Teratohyla pulverata* and possible translocation of a chromosome fragment of the pair 1 to 9 in *Hyalinobatrachium aureoguttatum* pair.

In conclusion, the chromosomes of the four species are highly conserved as they all have a chromosome number of $2n = 20$, and the morphology of their chromosomes varies between metacentric and submetacentric chromosomes.

Keywords: Centrolenidae, Chromosome, Cytogenetic, Karyotype, NOR.

3. INTRODUCCIÓN

Los centrolénidos son uno de los grupos más interesantes de anuros tanto por su morfología y características ecológicas, como por su filogenia y complejidad biogeográfica (Guayasamín *et al.*, 2008, Guayasamín *et al.*, 2009). Son conocidos generalmente como “ranitas de cristal”, poseen el cuerpo de color verde limón y aproximadamente un cuarto de las especies conocidas de esta familia, tienen la piel ventral transparente lo que permite ver órganos internos tales como corazón, hígado y tracto digestivo (Cisneros-Heredia y McDiarmid, 2007).

Habitan en las riberas de ríos, subdosel y dosel de bosques siempre verdes, semidesiduos, tropicales, nublados y en páramos (Cisneros-Heredia y McDiarmid, 2007).

Todas las especies son nocturnas y dejan sus huevos sobre hojas o piedras cercanas a riachuelos y cascadas (Cisneros-Heredia y McDiarmid, 2007).

Esta familia se distribuye a lo largo del Neotrópico, de manera continua desde el sur de México hasta Bolivia, con especies en la base de los ríos Amazonas y Orinoco, el Escudo Guyanés, la Sierra Nevada de Santa Marta en Colombia, la cordillera de la costa de Venezuela, los bosques del sudeste de Brasil y norte de Argentina y la más alta diversidad se encuentra en la parte norte de los Andes (Figura 1a) (Cisneros-Heredia y McDiarmid, 2007; Guayasamín *et al.*, 2009).

En 1951 Taylor propuso la familia Centrolenidae como tal, debido a la fusión encontrada entre la tibia (astrágalo) y la fíbula (calcáneo). Desde entonces ha sido considerada como una familia monofilética. Todas las ranas de cristal comparten el proceso medial dilatado del tercer metacarpiano, la forma de T en la sección terminal de las falanges, elemento intercalar entre la sección distal y penúltima de la falange, huevos depositados fuera del agua, peritoneo ventral parietal parcial o totalmente transparente, los ojos dirigidos hacia atrás a 45° en relación al eje del cuerpo, lo que supone visión binocular (Guayasamín, *et al.*, 2008, Guayasamín *et al.*, 2009).

Además, recientes estudios han situado a la familia Centrolenidae como taxón hermano de Allophrynidae, formando el clado Allocentrolenidae teniendo como sinapomorfía la forma de T o Y de la falange terminal (Frost *et al.*, 2006, Guayasamín *et al.*, 2009).

Hasta el 2009 se han identificado un total de 147 especies de centrolénidos, número que varía constantemente debido a la identificación de nuevas especies o de nuevos sinónimos añadidos anualmente. Incluso en la filogenia planteada por Guayasamín y colaboradores (2009), se menciona que la propuesta taxonómica se basa en un muestreo incompleto con 54% de las especies descritas. El 16% del total de las especies presenta asignación ambigua de especies a género; debido a homoplasia de caracteres morfológicos y que los datos moleculares resultan escasos (Guayasamín *et al.*, 2009).

Por estos antecedentes se hace necesario un mayor número de análisis tales como los citogenéticos que han probado ser útiles para el esclarecimiento de la sistemática en anuros (Howell y Black, 1980; Veiga-Menoncello *et al.*, 2003), pues responden a múltiples interrogantes que pueden ser aclaradas gracias a la correcta utilización de la información generada por el número de cromosomas presentes en cada célula, el tamaño o largo relativo, la morfología de cada uno de ellos, así como el patrón de bandas, ayudando al esclarecimiento de filogenias, clasificaciones y procesos de evolución (Córdova y Lamas, 1997).

La citogenética es una rama de la genética que se encarga de estudiar las características de los cromosomas, siendo éstos la unidad fundamental donde la información genética de la célula está debidamente organizada. La complejidad de los cromosomas aumenta conforme la evolución de los organismos (Lacadena, 1996), pudiendo variar en número, tamaño, morfología, calidad y cantidad de cromatina. Se ha observado que el 90% de los fenómenos de especiación están relacionados con cambios en el cariotipo característico de una especie, existiendo una gran variabilidad cromosómica, que puede ir desde variaciones inter o intra específicas hasta grupos taxonómicos mayores como por ejemplo familias (White, 1978).

Dentro de las herramientas que emplea la citogenética para describir los cromosomas se encuentran los bandeos; éstos tienen como finalidad encontrar regiones específicas dentro de los cromosomas, como es el caso de la región del organizador nucleolar donde se localizan nichos de genes que codifican para DNA

ribosomal; la ubicación de esta región en particular se da mediante impregnación argéntica (Lacadena, 1996). Otras técnicas de bandeos incluyen el bandeo C que localiza regiones de heterocromatina constitutiva, el bandeo Q que localiza regiones de DNA ricas en A-T o G-C que se tiñen con fluorocromos como por ejemplo quinacrina, DAPI, Hoechst 33258, entre otros (Lacadena, 1996).

Un aspecto relevante de los estudios citogenéticos es que permiten detectar cromosomas relacionados con la determinación sexual de los individuos, pese a que, en el caso específico de los anfibios, la presencia de este tipo de cromosomas es inusual, pues existen solo 9 familias (Pipidae, Bombinatoridae, Pelodytidae, Ranidae, Hylidae, Centrolenidae, Bufonidae, Leptodactylidae, Leiopelmatidae) en las se han detectado estos cromosomas. En caso de que existan cromosomas sexuales, éstos pueden pertenecer a dos tipos de sistemas: ZW/ZZ y XY/XX (Schmid *et al.*, 1991).

La obtención de datos de esta índole permitirá incrementar el limitado conocimiento citogenético de centrolénidos, ya que hasta el momento solo existen descripciones del número cromosómico de *Hyalinobatrachium fleischmanni*, *Sachatamia albomaculata*, *Vitreorana eurygnatha*, *Cochranella granulosa*, *Espadarana prosoblepon*, y *Vitreorana antisthenesi* que reportan un número diploide de 20 cromosomas (Bogart, 1973; Duellman, 1967; Duellman y Cole, 1965; Schmid *et al.*, 1989).

Tomando en cuenta la necesidad de incrementar los datos citogenéticos existentes de ranas de cristal en el Ecuador se plantea la presente investigación que se centra en la descripción del cariotipo de cuatro especies de la familia Centrolenidae, mediante la utilización de técnicas de tinción, la determinación del número y morfología cromosómica, la identificación de la región del organizador nuclear (NOR) a través del bandeo con nitrato de plata y la detección de variaciones cromosómicas interespecíficas.

Las especies analizadas son: *Nymphargus grandisonae*, *Hyalinobatrachium aureoguttatum*, *Teratohyla spinosa*, *Teratohyla pulverata* (Figura 2) cuyos géneros forman parte de los 12 descritos para la familia Centrolenidae:

El género *Nymphargus* posee 34 especies; su nombre viene del griego “*nýmphae*” que hace alusión a las ninfas y “*argus*” en relación a Argus primo de la ninfa Io, un gigante de 100 ojos que se asemejan a los ocelos ubicados en la parte dorsal de cuatro especies de este género *Anomalous*, *Cochranae*, *Ignotus*, y *Laurae* (Cisneros-Heredia y McDiarmid, 2007; Guayasamín *et al.*, 2009).

Son endémicos de los Andes y sus estribaciones en Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia. La mayoría de las especies están restringidas entre los 1000 y 2800 m.s.n.m. solo *N. cochrae*, *N. laurae*, y *N. puyoense* se han encontrado a elevaciones menores, en las pendientes amazónicas de los Andes (Figura 1b) (Guayasamín *et al.*, 2009).

Poseen la membrana interdigital de los dedos III y IV reducida, característica compartida por todas las especies de este género. Además espinas humerales ausentes excepto en los machos de *N. grandisonae*, los cuales tienen una espina pequeña, hígado tri o tetra-lobulado cubierto por peritoneo hepático transparente, peritoneo ventral parietal blanco en la parte anterior y transparente en la posterior; en vida poseen huesos verdes (blancos en *N. rosadus* y *N. anomalus*) (Guayasamín *et al.*, 2009). El dorso de los especímenes preservados es lavanda con o sin puntos y en machos usualmente presenta espínulas conspicuas durante la temporada de apareamiento; los machos reproductivos poseen un parche nupcial conspicuo tipo I y machos hacen los llamados sobre las hojas. Las hembras depositan sus huevos sobre hojas que están a lo largo de las corrientes de los ríos (Guayasamín *et al.*, 2009).

El género *Hyalinobatrachium* posee 28 especies; su nombre viene del griego “*hyalos*” que quiere decir cristal y “*batrachion*” que quiere decir rana, en referencia al aspecto frágil y translucido de las especies de este género.

Este género está ampliamente distribuido a lo largo de los bosques tropicales de centroamericana y los Andes, la cordillera de la costa de Venezuela, Tobago, la región norte de la base del Amazonas, el Escudo Guyanés, en alturas que van desde el nivel del mar hasta los 2500 m.s.n.m. (Figura 1c) (Guayasamín *et al.*, 2009).

Este género puede ser fácilmente diferenciado de otras ranas de cristal porque posee el peritoneo parietal ventral completamente transparente mientras que el que recubre el tracto digestivo e hígado, es blanco, y no posee espinas humerales. Adicionalmente, los especímenes vivos poseen los huesos blancos, excepto *H. mesai* y *H. taylori*, especies que presentan huesos verdes. Su coloración dorsal es blanca o crema; durante la temporada de cría los machos pierden las espínulas dorsales; cuando están presentes los callos nupciales son pequeños y están restringidos al límite interno del dedo I. Tienen el proceso dentígero del vómer ausente. Los machos vocalizan desde el envés de las hojas y las hembras depositan una capa de huevos también en el envés. Poseen fusión completa de la tibia y fíbula. Entre otras homologías derivadas están el poseer pequeños huesos nasales extensamente separados uno de otro y posee dos fontanelas parietales expuestas, aunque este carácter puede ser ambiguo ya que están parcial o completamente cubiertas en *H. aureoguttatum*, *H. bergeri*, y *H. chirripoi* (Guayasamín *et al.*, 2009).

El género *Teratohyla* posee cuatro especies; su nombre viene del griego “*teras*” que significa monstruo o magnifico y la palabra “*Hyla*” asociada a ranitas arborícolas. Se distribuye en las tierras bajas de Centro América, del Pacífico y Amazonia de Sur América, bajo los 1000 m.s.n.m (Figura 1d) (Guayasamín *et al.*, 2009).

Entre las características más conspicuas del género están espinas humerales ausentes, hígado cubierto por una membrana peritoneal transparente en *T. midas*

y *T. spinosa* o blanca en *T. pulverata* y *T. amelia*, peritoneo del tracto digestivo translucido en *T. spinosa* o blanco en *T. pulverata*, *T. amelia* y *T. midas*; peritoneo parietal ventral anterior blanco y posterior transparente en *T. midas* y *T. spinosa*, o completamente transparente *T. amelia*, *T. pulverata*; membrana interdigital moderada a extensa entre los dedos III y IV; en vida huesos de verde pálido a verde oscuro; en individuos preservados el dorso es lavanda lechoso a lavanda oscuro con o sin puntos; proceso dentígero del vómer presente, con o sin dientes (Guayasamín *et al.*, 2009). Los machos llaman desde el haz de la hoja y las hembras depositan los huevos en las puntas de las hojas como por ejemplo *T. pulverata*, o a lo largo de los márgenes del envés como *T. spinosa*; espina prepólica saliente *T. spinosa* o no saliente *T. midas*, *T. amelia*, *T. pulverata* (Guayasamín *et al.*, 2009).

En el Ecuador existen estudios citogenéticos exclusivamente de las familias Dendrobatidae, Leptodactylidae e Hylidae, sin embargo, tal como se mencionó anteriormente, este tipo de información es aún desconocida para especies de centrolénidos por lo tanto la presente investigación resultará pionera y aportará con datos que incrementan el conocimiento general de los miembros de esta familia. Para ello se plantean los siguientes objetivos:

3. 1. Objetivo General:

Describir el cariotipo representativo de *Nymphargus grandisonae*, *Hyalinobatrachium aureoguttatum*, *Teratohyla spinosa* y *Teratohyla pulverata* (Anura: Centrolenidae).

3. 2. Objetivos Específicos:

- Establecer el número y morfología de los cromosomas mitóticos de las especies mencionadas.
- Determinar la distribución de la región del organizador nuclear (NOR) de cada una de ellas.
- Establecer similitudes o diferencias entre los cariotipos de los centrolénidos analizados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

4.1.1. ESPECÍMENES

Los especímenes analizados fueron: *Nymphargus grandisonae*, *Hyalinobatrachium aureoguttatum*, *Teratohyla spinosa* y *Teratohyla pulverata* (Figura 1). Dichos individuos fueron identificados por el PhD. Juan Manuel Guayasamín y depositados en el Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (QCAZ). Todo el análisis citogenético se realizó en el Laboratorio de Investigación de Cromosomas y Biomoléculas de Anfibios de la PUCE.

4.1.2. COLECTA

La colecta de los individuos de *Hyalinobatrachium aureoguttatum*, *Teratohyla spinosa* y *Teratohyla pulverata* se realizó en la localidad de Durango 1° 2' 30" N, 78° 37' 44" E al nor-orient de la provincia de Esmeraldas mientras que los especímenes de *Nymphargus grandisonae* se colectaron cerca de la cascada Tres Marías a 1 km. al sur de Chilma Bajo, en la provincia del Carchi 0° 51' 53" N, 78° 02' 59" E (Tabla 1).

4.1.3. MANTENIMIENTO

Se mantuvieron los individuos en terrarios húmedos, y fueron alimentados con moscas de la fruta (*Drosophyla melanogaster*) para estimular la división mitótica

de las microvellocidades del duodeno, tejido del que se obtuvieron las muestras a procesar.

4.2. PROCESAMIENTO DE INDIVIDUOS

4.2.1. PREPARACIÓN DEL DUODENO

Para inhibir la división celular de las microvellocidades duodenales en metafase, se inyectó intraperitonealmente 0,01 ml. de colchicina al 2% diluida en rínger de anfibios, por cada 0,1 g. de peso del individuo. Los animales colchicinados fueron incubados *in vivo* durante 4 horas para luego ser sacrificados mediante hipotermia. Luego se disectaron los individuos bajo el estereomicroscopio Ziess Stemi 1000; se extrajo el duodeno al que se le abrió longitudinalmente y se lavó con rínger de anfibios eliminando los desechos.

4.2.2. PROCESAMIENTO DEL TEJIDO

Una vez limpio el intestino se procedió a la hipotonización y fijación del mismo usando los protocolos de Egozcue (1971), Schmid (1978) y King y Rofe (1976) con modificaciones.

Para la hipotonización, el intestino fue colocado en rínger:agua destilada en propoción 4:1, a 37 °C durante 20 minutos. Para la fijación, el intestino fue transferido a una caja petri con fijador (metanol:ácido acético 3:1) recién preparado y frío, por 10 minutos.

4.3. PREPARADOS CROMOSÓMICOS

4.3.1. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN CELULAR

Con la ayuda de dos paletas se raspó delicadamente el interior del duodeno, tratando de no romper el tejido conectivo y separando únicamente el tejido correspondiente a las microvellosidades.

Finalizado el raspado, se retiró el tejido conectivo y se trasladó el fijador con las células intestinales a un tubo Falcon de 15 ml.; se aforó a 5 ml. con fijador y se pipeteó hasta disgregar totalmente el tejido para conseguir una suspensión uniforme. El material pipeteado fue centrifugado durante 7 minutos a 1500 r.p.m. y se eliminó el sobrenadante conservando el pellet, que fue resuspendido con nuevo fijador.

4.3.2. GOTEIO DE LA SUSPENSIÓN CELULAR

Se lavaron placas nuevas con jabón y metanol puro, las mismas que fueron secadas en un horno a 40 °C, rotuladas y puestas sobre un recipiente con agua caliente. Con una pipeta Pasteur se gotearon de 3 a 4 gotas de suspensión celular por placa, a una altura de 1,7 m. Luego del goteo las placas se dejaron secar a temperatura ambiente.

4.4. TRATAMIENTO PARA CROMOSOMAS FIJADOS EN LAS PLACAS

4.4.1. TINCIÓN CON GIEMSA

Se diluyó Giemsa en agua destilada en una proporción de 1:20; se vertió la solución en un coplin y se tiñó durante 10 minutos; finalmente se enjuagó con abundante agua destilada.

4.5. BANDEO CROMOSÓMICO

4.5.1. BANDEO NOR (REGIÓN DEL ORGANIZADOR NUCLEOLAR)

Las mejores placas obtenidas con la tinción de Giemsa fueron desteñidas con fijador. Estas poseían como mínimo un mes de haber sido goteadas. Se siguió el protocolo establecido por Howell y Black (1980) con modificaciones; en cada placa se goteó solución de nitrato de plata al 50% y solución de gelatina al 2% en proporción 2:1, y se tapó con un cubreobjeto. Las placas fueron puestas en un horno a 60°C durante aproximadamente 12 - 15 minutos o hasta cuando tomaron un color ámbar; el tiempo de incubación requerido fue independiente para cada individuo y cada especie; luego se retiró el cubreobjeto y se lavó con agua mili-Q. Se fotografió y se determinó la región del organizador nucleolar.

4.6. CARIOTIPAJE

4.6.1. REVISIÓN DE PLACAS

Para la ubicación de metafases se usó el fotomicroscopio Ziess Axioskop 2 plus. Se buscó haciendo un barrido por toda la placa con objetivo de 10X y optovar 1,6X o 2X. Las mejores metafases fueron registradas en placas de fondo blanco para ubicarlas y fotografiarlas posteriormente.

4.6.2. OBTENCIÓN DE IMÁGENES

Las mejores metafases de cada individuo, con el número cromosómico completo fueron fotografiadas mediante la cámara Cannon PowerShot A640; Los aumentos utilizados fueron los objetivos de 63X y 100X; y optovar 1,6X; y 2.5X. Los filtros usados fueron verde y celeste.

4.6.3. ELABORACIÓN DE CARIOTIPOS E IDEOGRAMAS

Para la edición de las fotografías se utilizó el programa Adobe Photoshop versión 13.0 para Mac OS, se modificó el contraste y/o el brillo en caso de ser necesario, se recortaron los cromosomas, se los ordenó por parejas en orden descendente de acuerdo a la longitud y se guardaron con formato JPEG.

Para medir los cromosomas se utilizó el software Axio Vision 4.4 para PC (Zeiss, 2005); se usaron las escalas previamente ingresadas en el programa dependiendo del aumento en el cual fueron tomadas las fotos, las medidas se tomaron a partir del centrómero hasta el final de los brazos cortos y largos de cada cromosoma, y se tabularon los resultados.

Las medidas fueron ingresadas en hojas de cálculo para determinar el promedio de la longitud relativa, el índice y radio centroméricos, de cada uno de los cromosomas de cada par cromosómico, de todas las metafases encontradas para cada individuo y con estos datos se procedió a obtener el promedio para cada especie, todos estos cálculos permitieron determinar la morfología cromosómica siguiendo la nomenclatura de Green y Sessions (1991).

Siguiendo lo establecido por Schmid y sus colaboradores en 1989, se dividió a los cromosomas en dos grupos el primero formado por cromosomas de mayor longitud relativa y el segundo formado por cromosomas de menor longitud relativa.

Con estos datos se estableció el ideograma representativo de cada especie incluyendo la correspondiente ubicación del NOR.

4.6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para *Nymphargus grandisonae* se realizó un ANOVA de un factor con los datos de longitud relativa (LR) para encontrar diferencias entre los grupos de cromosomas grandes y pequeños, además una prueba de homogeneidad de variancias con los mismos datos. Debido a que no hubo homogeneidad se realizó la prueba T para muestras independientes.

En *Hyalinobatrachium aureguttatum* se realizó un ANOVA de un factor con los datos de longitud relativa (LR) para encontrar diferencias entre los grupos, además una prueba de homogeneidad de variancias.

En las dos especies estudiadas del género *Teratohyla*: *T. pulverata* y *T. spinosa* se analizaron los grupos cromosómicos usando pseudorepeticiones debido a la falta de muestras, y se realizaron los correspondientes gráficos de cajas (Figuras 2 y 3).

5. RESULTADOS

5.1. DESCRIPCIÓN DE LOS CROMOSOMAS MITÓTICOS.

Las cuatro especies de Centrolenidae: *Nymphargus grandisonae*, *Hyalinobatrachium aureoguttatum*, *Teratohyla spinosa* y *Teratohyla pulverata* (Figura 2), poseen el mismo número cromosómico que es 20 en condición diploide. Además se diferencian dos grupos cromosómicos el primero, grupo A, conformado por ocho pares que decrecen paulatinamente en longitud relativa y el grupo B, por dos pares más pequeños que los anteriores (Tablas 2 y 3; Figuras 3 y 4).

5.2. DESCRIPCIÓN DE LOS CROMOSOMAS MITÓTICOS DE *Nymphargus grandisonae*.

Se analizaron seis individuos, de los cuales cinco fueron machos, y del ejemplar restante no se pudo determinar su sexo. Las metafases analizadas por cada individuo variaron llegando a encontrar un total de 56 núcleos completos con un número cromosómico de $2n = 20$ (Tabla 1).

5.2.1. MORFOLOGÍA DE LOS CROMOSOMAS MITÓTICOS DE *Nymphargus grandisonae*.

En esta especie los pares 1, 2, 3, 5, 6, y 8 pertenecientes al grupo A y son metacéntricos mientras que los pares 4 y 7 del mismo grupo son submetacéntricos. Dentro del grupo B el par 9 es submetacéntrico mientras que el par 10 es metacéntrico (Figuras 5a, y 5b), cabe mencionar que en el par 9 en la

región terminal de los brazos largos (q) se detectó una constricción secundaria (Figura 5a).

5.2.2. DESCRIPCIÓN DE LAS BANDAS NOR EN *Nymphargus grandisonae*.

La región del organizador nucleolar se ubicó dentro del grupo B en el par submetacéntrico 9, esta banda está ubicada en la región terminal de los brazos largos de este par y coincide con la constricción secundaria antes reportada (Figuras 5b y 5c).

5.3. DESCRIPCIÓN DE LOS CROMOSOMAS MITÓTICOS DE *Hyalinobatrachium aureoguttatum*.

Se analizó un total de cinco individuos de esta especie, tres fueron identificados como machos y de los dos individuos restantes no se pudo determinar el sexo. Las metafases por cada individuo variaron en cada uno llegándose a estudiar 42 núcleos completos con un número cromosómico de $2n = 20$ (Tabla 1).

5.3.1. MORFOLOGÍA DE LOS CROMOSOMAS MITÓTICOS DE *Hyalinobatrachium aureoguttatum*.

En esta especie los pares 2, 5, 7 y 8 pertenecientes al grupo A son metacéntricos mientras que los pares 1, 3, 4 y 6 del mismo grupo son submetacéntricos, dentro del grupo B el par 9 es submetacéntrico mientras que el par 10 es metacéntrico (Figuras 6a y 6b); cabe mencionar que en el par 9 en la región media de los brazos largos (q) se detectó una constricción secundaria (Figura 6a).

5.3.2. DESCRIPCIÓN DE LAS BANDAS NOR EN *Hyalinobatrachium aureoguttatum*.

La región del organizador nucleolar se ubicó dentro del grupo B en el par submetacéntrico 9; esta banda se encuentra en la constricción secundaria ubicada en la región media de los brazos largos de este par (Figuras 6b y 6c).

5.4. DESCRIPCIÓN DE LOS CROMOSOMAS MITÓTICOS DE *Teratohyla pulverata*.

Se analizó un individuo del sexo masculino; se encontraron 6 núcleos completos con un número cromosómico de 20 en condición diploide (Tabla 1).

5.4.1. MORFOLOGÍA DE LOS CROMOSOMAS MITÓTICOS DE *Teratohyla pulverata*.

En esta especie los pares 1, 2, 4, 5 y 6 pertenecientes al grupo A son metacéntricos mientras que los pares 3, 7 y 8 del mismo grupo son submetacéntricos, dentro del grupo B el par 9 es subtelocéntrico mientras que el par 10 es metacéntrico (Figuras 6a y 6b).

Además, en este individuo se detectó una constricción secundaria en el par 9 que está constituido por los cromosomas 9a y 9b, los mismos que resultaron ser heteromórficos, pues el cromosoma 9a es submetacéntrico, mientras que el cromosoma 9b es netamente telocéntrico, y se puede notar que el cromosoma 9a es más grande que el cromosoma 9b (Figuras 7a y 7c).

5.4.2. DESCRIPCIÓN DE LAS BANDAS NOR EN *Teratohyla pulverata*.

La región del organizador nucleolar se ubicó dentro del grupo B en el par 9 subtelocéntrico, en la mitad de los brazos largos, lo que también coincide con la constricción secundaria (Figuras 7b y 7c).

5.5. DESCRIPCIÓN DE LOS CROMOSOMAS MITÓTICOS DE *Teratohyla spinosa*.

Se analizaron dos individuos, un macho y una hembra. Se encontraron 20 núcleos completos, 10 por cada individuo, todos con un número cromosómico de $2n = 20$ (Tabla 1).

5.5.1. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE *Teratohyla spinosa*.

En esta especie los pares 1, 2, 3, 4, 5 y 6 pertenecientes al grupo A son metacéntricos mientras que los pares 7 y 8 del mismo grupo son submetacéntricos, dentro del grupo B el par 9 es metacéntrico mientras que el par 10 es submetacéntrico. La constricción secundaria se ubicó en la región media del brazo p del par 2 (Figura 8a).

5.5.2. DESCRIPCIÓN DE LAS BANDAS NOR EN *Teratohyla spinosa*.

La región del organizador nucleolar se ubicó dentro del grupo A en el par 2 metacéntrico. La región del NOR se ubicó en la mitad de los brazos q de este par, en el mismo lugar de la constricción secundaria (Figuras 8b y 8c).

5.6. LONGITUDES RELATIVAS

Se obtuvo un promedio de las longitudes relativas para cada especie, en base a los promedios relativos de cada individuo (Tabla 4).

5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para las longitudes relativas (LR) de *Nymphargus grandisonae* en la prueba de homogeneidad se encontraron diferencias altamente significativas entre las variancias de los individuos (Tabla 5), por lo que se procedió a realizar la prueba de T de Student para muestras independientes, encontrándose también diferencias altamente significativas para los grupos de cromosomas A y B (Tabla 2).

En *Hyalinobatrachium aureguttatum*, para las longitudes relativas (LR), no se encontraron diferencias en la prueba de homogeneidad entre las variancias (Tabla 6) por lo que procedió a realizar un ANOVA de un factor donde se encontraron diferencias altamente significativas entre los grupos de cromosomas A y B (Tabla 3).

En las especies *Teratohyla pulverata* y *Teratohyla spinosa* no se pudieron realizar análisis estadísticos debido a la escases de individuos (pocas repeticiones), sin embargo se realizaron diagramas de cajas para cada especie (Figuras 3 y 4) que nos muestran claramente dos grupos definidos.

6. DISCUSIÓN

Resulta indiscutible el hecho de que la citogenética aporta con datos sustanciales que complementan el conocimiento de las especies pues, tal como lo sostiene Córdova y Lamas (1997) el cariotipo puede ser considerado el único elemento homólogo entre los seres vivos que permite comparaciones físicas con alto grado de coherencia y congruencia, a tal punto que posibilita clarificar y/o ratificar la ubicación taxonómica y las relaciones filogenéticas de las mismas.

Pese a ello, hasta el momento únicamente se conoce el número cromosómico de cinco de las 147 especies de centrolénidos descritos a nivel mundial (Bogart, 1973; Duellman, 1967; Duellman y Cole, 1965), y solo se ha estudiado minuciosamente el cariotipo de *Vitreorana antisthenesi*, pues Schmid y colaboradores (1989), analizaron los cromosomas mitóticos y meióticos detallando el número, longitud y morfología cromosómica, además del patrón de bandas C, DAPI, Q, H y NOR.

Este tipo de información es escasa para las 55 especies de centrolénidos ecuatorianos registrados en la base de datos del Museo de Herpetología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (QCAZ) (Ron *et al.*, 2013), por ello este estudio contribuye con el análisis cromosómico de cuatro especies de ranas de cristal del Ecuador: *Nymphargus grandisonae*, *Hyalinobatrachium aureoguttatum*, *Teratohyla spinosa* y *Teratohyla pulverata*.

Pese a que estas cuatro especies de centrolénidos están distribuidas en tres clados diferentes, según la filogenia de Guayasamín y colaboradores (2009), éstas mantienen un número cromosómico diploide común de $2n=20$, que concuerda con lo descrito para *Hyalinobatrachium fleischmanni*, *Sachatamia albomaculata*, *Vitreorana eurygnatha*, *Cochranella granulosa*, *Espadarana prosoblepon*, y *Vitreorana antisthenesi* (Bogart, 1973; Duellman, 1967; Duellman y Cole, 1965; Schmid *et al.*, 1989), especies que se encuentran distribuidas en de cinco clados distintos; y para siete especies de centrolénidos ecuatorianos *Centrolene ballux*, *Espadarana prosoblepon*, *Hyalinobatrachium fleischmanni*, *Nymphargus anomalus*, *Nymphargus griffithsi*, *Nymphargus siren*, *Sachatamia albomaculata* (Blasco-Zuñiga *et al.*, in prep.; Blasco-Zuñiga *et al.*, 2011), distribuídas en cinco clados. Esto sugeriría que el número cromosómico $2n = 20$ es conservado para la familia, presentándose en ocho de los diez clados propuestos en la filogenia, que podría deberse a un proceso de convergencia, tal como sucede con la familia Dendrobatidae (Aguiar *et al.*, 2002; Guayasamín *et al.*, 2009).

Cabe mencionar que especies dentro del clado Hyloidea, en el que se incluye además de centrolénidos a familias como Hylidae, Dendrobatidae, Leptodactylidae (Frost *et al.*, 2006; Guayasamín *et al.* 2009), poseen mayoritariamente un número cromosómico de $2n = 24$ (carácter ancestral) (Aguiar *et al.*, 2002; Bogart, 1995; Bogart, 1991; Veiga-Menoncello *et al.* 2003), por lo que la reducción del número cromosómico a $2n = 20$ (carácter derivado) en las ranas de cristal, podría ser consecuencia de translocaciones desiguales en cromosomas pequeños

produciendo reducción en el número de cromosomas, tal como lo sugiere Schmid *et al.* (1989), cuando hace alusión al trabajo de Morescalchi publicado en 1973. Este tipo de fenómeno al igual que fusiones, fisiones, translocaciones, inversiones, podrían también explicar la reducción del número cromosómico en las familias antes mencionadas del clado Hyloidea (Aguilar *et al.*; 2002; Bogart y Hedges 1995; Busin *et al.* 2001; Miura *et al.* 1995; Veiga-Menoncello *et al.* 2003).

De acuerdo al tamaño que presentan los 20 cromosomas de los centrolénidos analizados, éstos se pueden clasificar claramente en dos grupos, el primero formado por cromosomas grandes (grupo A) en el que se incluyen los pares cromosómicos 1-8 y el segundo conformado por cromosomas pequeños (grupo B) que lo constituyen las parejas 9 y 10. Esta agrupación está sustentada en base a los análisis estadísticos realizados (Figuras 3, 4 y Tablas 2, 3), y está en concordancia con lo propuesto por Schmid y colaboradores (1989), quienes también hacen referencia a los dos grupos de cromosomas grandes y pequeños.

La morfología de los pares cromosómicos de *Nymphargus grandisonae*, *Hyalinobatrachium aureoguttatum*, *Teratohyla spinosa* y *T. pulverata* varían de forma indistinta en las diferentes especies cambiando básicamente entre metacéntricos y submetacéntricos (Tabla 7). Resultó interesante verificar que los pares cromosómicos 2 y 5 mantienen una forma metacéntrica al igual a que los de *Vitreorana antisthenesi*, lo que permitiría inferir que estos pares cromosómicos son homólogos y conservados para estas cinco especies (Tabla 7) (Schmid, *et al.*, 1989). Esta morfología metacéntrica se mantiene también en el par 1, excepto en

Hyalinobatrachium aureoguttatum, especie que presenta este par submetacéntrico (Tabla 7) (Schmid, *et al.*, 1989). Esta discrepancia en la morfología podría corresponder a la diferencia registrada en la longitud relativa que presenta el par 1 de esta especie en comparación con las demás, pues como se puede ver en la Tabla 4, en *H. aureoguttatum* este cromosoma tiene aproximadamente un 3% menos en su longitud relativa promedio (LR). Por otro lado en el par 9 de esta especie se nota un incremento de igual proporción en su longitud, esto podría permitirnos presumir que el cambio en la morfología del par 1 se debe a una probable translocación. Al respecto, Aguiar y colaboradores (2002) aducen que las translocaciones e inversiones pudieron ser la causa para la reestructuración morfológica de los cromosomas dentro de la familia Dendrobatidae.

Dentro del género *Teratohyla* existe un mayor número de cromosomas homólogos, los pares 1, 2, 4, 5, 6 son todos metacéntricos y los pares 7 y 8 son submetacéntricos para ambas especies (Tabla 7), datos que sustentan su ubicación en el mismo clado propuesto por Guayasamín y colaboradores (2009), soportando así la teoría de que son especies que están íntimamente relacionadas.

Un aspecto que llama mucho la atención es el hecho de que el par cromosómico 9 de *T. pulverata* resultó ser heteromórfico, pues como se puede constatar en la Tabla 4, existe una diferencia tanto en el tamaño de los miembros del par 9, como en la morfología de los mismos (Figuras 7a y 7b; Tabla 7), suceso que también es

reportado por Schmid y colaboradores (1989) para el par 6 de *Vitreorana antisthenesi*, quien sostiene que el par 6 heteromórfico corresponde a los cromosomas sexuales XY. Tomando en cuenta que el individuo de *T. pulverata* es macho (Tabla 1) se propondría que el par 9 heteromórfico corresponde también al par sexual. Sin embargo, no se puede hacer esta aseveración hasta no contar con el estudio cromosómico de un número representativo de machos y hembras que permita llegar a una conclusión contundente al respecto. Adicionalmente, tomando en cuenta que existen reportes acerca de que en los cromosomas sexuales heteromórficos existe incremento de heterocromatina, se requeriría también realizar bandeo C, pues esta técnica permitiría constatar la presencia de este tipo de cromatina (Targueta *et al.*, 2010; Schmid *et al.*, 1991). Hay que tomar en cuenta además que a diferencia de lo que ocurre en *V. antisthenesi*, cuyos cromosomas sexuales son del mismo tamaño (Schmid *et al.*, 1989), en *T. pulverata* los cromosomas que se presumen sexuales son de diferente tamaño lo mismo que sucede en *Gastrotheca walkeri* y *G. ovifera* (Schmid *et al.*, 1991), lo que hace más evidente el heteromorfismo que podría estar relacionado a la determinación del sexo.

La diversificación de cromosomas homólogos hacia cromosomas heteromórficos sexuales es resultado de varios pasos evolutivos secuenciales (Schmid *et al.*, 1991). A lo largo del tiempo los anuros han desarrollado dos tipos de sistemas cromosómicos para la determinación sexual: ZW/ZZ por ejemplo como sucede en *Bufo bufo* y XY/XX como sucede en *Vitreorana antisthenesi*. Al presentarse el par 9 heteromórfico en el macho analizado de *T. pulverata* se propone que la

determinación sexual para esta especie sería del sistema XY/XX. Sin embargo, cabe resaltar que en general son pocas las especies de anuros en las que se presentan cromosomas heteromórficos sexuales ya que solo se encuentra en 9 familias (Pipidae, Bombinatoridae, Pelodytidae, Ranidae, Hylidae, Centrolenidae, Bufonidae, Leptodactylidae, Leiopelmatidae) (Lacadena, 1996; Schmid *et al.*, 1991).

Por otro lado un importante marcador citogenético utilizado para la caracterización de especies, es la ubicación de la región del Organizador Nucleolar, NOR, por lo que en el presente trabajo se aplicó la técnica de impregnación argéntica que permitió detectar la presencia de NOR en el par 9 de *Nymphargus grandisonae*, *Hyalinobatrachium aureoguttatum* y *Teratohyla pulverata*, mientras que en *T. spinosa*, en el par 2 (Figuras 5 b-c; 6 b-c; 7 b-c y 8 b-c).

Resulta interesante que a pesar de que *Teratohyla pulverata* y *T. spinosa* pertenecen al mismo género y están estrechamente relacionadas, estas especies presentan el NOR en diferentes pares cromosómicos, pues como se mencionó anteriormente, *T. pulverata* tiene en el par 9 y *T. spinosa* en el 2. Esta variación cromosómica interespecífica sugiere procesos evolutivos que implican rearrreglos de la banda NOR, que podrían ser explicados mediante mutaciones cromosómicas de translocación y/o inversiones (Aguiar *et al.*, 2002; Schmid *et al.*, 1995).

Cabe destacar el hecho de que Schmid y colaboradores reportaron en 1989 que *Vitreorana antisthenesi* tiene el NOR en el par cromosómico 2, lo que coincide con lo encontrado en este trabajo para *T. spinosa*. Este hecho sustentaría la relación filogenética propuesta por Guayasamín y colaboradores en el 2009, en la que los géneros *Vitreorana* y *Teratohyla* poseen un ancestro en común.

En definitiva, los datos cromosómicos hasta aquí analizados incrementan el conocimiento de los miembros de la familia Centrolenidae, y con este trabajo se ratifica que la citogenética es una herramienta extremadamente útil, no solo en la caracterización de las especies, sino también en la clarificación o ratificación de la taxonomía y filogenia de las mismas.

7. CONCLUSIONES

El número cromosómico en condición diploide de los centrolénidos estudiados: *Nymphargus grandisonae*, *Hyalinobatrachium aureoguttatum*, *Teratohyla spinosa* y *Teratohyla pulverata* es $2n=20$, número cromosómico que se mantiene para todas las especies de centrolénidos hasta el momento cariotipadas.

El cariotipo de especies de la familia Centrolenidae está conformado por dos grupos de cromosomas, el grupo de cromosomas grandes (grupo A) que incluye los pares cromosómicos 1-8 y un grupo de cromosomas pequeños (grupo B) que incluye los pares cromosómicos 9 y 10.

La morfología de los cromosomas de los centrolénidos analizados varía de forma indistinta entre las diferentes especies, fluctuando básicamente entre cromosomas metacéntricos y submetacéntricos excepto en el cromosoma 9b de *Teratohyla pulverata* que es telocéntrico.

Los pares cromosómicos 2 y 5 para las cuatro especies estudiadas y para *Vitreorana antisthenesi* mantienen una forma metacéntrica, lo que permitiría inferir que estos pares cromosómicos son homólogos y conservados.

En *Hyalinobatrachium aureoguttatum* se detectó el cambio de morfología en el par 1, de metacéntrico a submetacéntrico, cambio que se presume podría deberse a

una translocación de un fragmento del brazo p del cromosoma 1 al brazo q del cromosoma 9.

En las dos especies del género *Teratohyla*: *T. pulverata* y *T. spinosa* existe un mayor número de cromosomas morfológicamente similares ratificando su ubicación en el mismo clado dentro de la filogenia de la familia.

El par cromosómico 9 de *T. pulverata* está constituido por cromosomas hetermórficos. Tomando en cuenta que el individuo analizado de *T. pulverata* es macho, se presume que este par corresponde a cromosomas sexuales del sistema XY.

La región del organizador nucleolar en *Nymphargus grandisonae*, *Hyalinobatrachium aureoguttatum* y *Teratohyla pulverata*, se encuentra en el par 9 mientras que en *T. spinosa*, en el par 2.

Los datos cromosómicos en relación a la ubicación del NOR en el par 2 de *Teratohyla spinosa* y *Vitreorana antisthenesi* corroboran la filogenia de la familia Centrolenidae, en la que se constata que estas especies poseen un ancestro común.

8. RECOMENDACIONES

Tomando en cuenta el reducido número de especímenes analizados de *Teratohyla pulverata* y *T. spinosa*, se recomienda incrementar el número de individuos para entender lo que sucede con los cromosomas de este género.

Para ratificar si el par 9 heteromórfico de *Teratohyla pulverata* corresponde a un par sexual o si se trata de un polimorfismo intraespecífico del mismo, se debería estudiar un número representativo de individuos machos y hembras de esta especie. Además, tomando en cuenta que los cromosomas sexuales se caracterizan por poseer mayor cantidad de heterocromatina que los autosomas, se recomienda aplicar la técnica de bandeo C que permite detectar la presencia y cantidad de este tipo de cromatina.

Por el hecho de haber encontrado que *Teratohyla spinosa* posee la región del organizador nucleolar en el par 2 y no en el 9 como en *T. pulverata* y los otros centrolénidos analizados, se hace necesario estudiar los cromosomas de las otras especies de este género: *T. ameliae* y *T. midas* para poder entender la dinámica de la ubicación de este marcador cromosómico dentro de este clado.

Como existe el reporte de que *Vitreorana antisthenesi* también posee el NOR en el par 2, se recomienda estudiar más especies de este género para dilucidar así las relaciones filogenéticas dentro de la familia Centrolenidae.

Considerando que este trabajo es el primer reporte de cromosomas de centrolénidos ecuatorianos, se recomienda que a partir de éste se incrementen los datos citogenéticos utilizando técnicas adicionales como bandeo C, tinción DAPI, e hibridación fluorescente *in situ* (FISH), que aportarían con información mas detallada.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adobe Systems Incorporated, 2012. Adobe Photoshop CS6. San Jose. USA.

Aguiar-Jr, O., Lima, A. y Giaretta, A. 2002. Cytogenetic analysis of four poison frogs of the *Epipedobates* genus (Anura - Dendrobatidae). *Herpetologica* 58: 293-303.

Blasco-Zuñiga, A., García-Iturralde, S. y Rivera, M. 2011. Estudios cromosómicos de ranas de cristal ecuatorianas (Anura: Centrolenidae). En: Memorias XXXV Jornadas nacionales de Biología. Sociedad Ecuatoriana de Biología, Núcleo Pichincha. pp. 127.

Bogart J. 1973. Evolution of anuran karyotypes. En: *Evolutionary biology of the anurans contemporary research on major problems*. Capítulo 12 (Vial, J.) pp 337-349. University of Missouri Press, Columbia, USA.

Bogart J. 1991. The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. En: *Amphibian cytogenetics and evolution*. Chapter 11. (Green, D. y Sessions, S.) pp 299-331. Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, San Diego, USA.

- Bogart, J. y Hedges, D. 1995. Rapid chromosome evolution in Jamaican frogs of the genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae). J. Zool. Lond. 235: 9-31.
- Busin, C., Vinciprova, G. y Recco-Pimentel, S. 2001. Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia-Anura). Genetica 110: 131–141.
- Cisneros-Heredia, D. y McDiarmid, R. 2007. Revision of the characters of Centrolenidae (Amphibia: Anura: *Athesphatanura*), with comments on its taxonomy and the description of new taxa of glassfrogs. Zootaxa 1572: 1-82.
- Córdova, J. y Lamas, G. 1997. Citogenética, filogenia, clasificaciones naturales y evolución de las especies. Alma Mater 13-14: 95-112.
- Duellman, W. 1967. Additional Studies Of Chromosomes Of Anuran Amphibians. Systematic Zoology 16: 38-43.

Duellman, W. y Cole, C. 1965. Studies of Chromosomes of Some Anuran Amphibians (Hylidae and Centrolenidae). *Systematic Zoology* 14: 139 – 143.

Egozcue, J. 1971, *Técnicas de Citogenética*. Editorial Espaxs, Barcelona, España.

Frost, D., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R., Haas, A., Haddad, C., De Sa, R., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S., Raxworthy, C., Campbell, J., Blotto, B., Moler, P., Drewes, R., Nussbaum, R., Lynch, J., Green, D. y Wheeler, W. 2006. The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 297:1-370.

Green, D. y Sessions, S. 1991. *Amphibian cytogenetics and evolution*. Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, San Diego, USA.

Guayasamín, J., Castroviejo-Fisher, S., Ayarzagüena, J., Trueb, L. y Vilà, C. 2008. Phylogenetic relationships of glassfrogs (Centrolenidae) based on mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 574-595.

Guayasamín, J., Castroviejo-Fisher, S., Trueb, L., Ayarzagüena, J., Rada, M. y Vilà, C. 2009. Phylogenetic systematics of Glassfrogs (Amphibia: Centrolenidae) and their sister taxon *Allophryne ruthveni*. Zootaxa 2100: 1–97.

Howell, W. y Black, D. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus regions with protective colloidal Developer: a 1-step method. Experiencia 36:1014-1015.

King, M. y Rode, R. 1976. Karyotypic variation in the Australian gekko *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Gekkonidae: Reptilia). Chromosoma, 54:75-87.

Lacadena, J. R. 1996. Citogenética, Editorial Complutense, Madrid, España.

Miura, I., Nishioka, M. y Borkin, L. 1995. The origin of the brown frogs with $2n=24$ chromosomes. Experientia 51: 179-188.

Ron, S., Guayasamin, J. y Yanez-Muñoz, M. 2013. AmphibiaWebEcuador. [en línea]. Ver. 2013.0. (2012). Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador. <<http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/anfibios/AnfibiosEcuador>>. [Consulta: 13 de abril, 2013.]

- Schmid, M. 1978. Chromosome banding in amphibia. I: Constitutive heterocromatin and nucleolus organizer region in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* 66:361-388.
- Schmid, M., Feichtinger, W., Weimer, R., Mais, C., Bolaños F. y León O. 1995. Chromosome banding in Amphibia, XXI. Inversion polymorphism and multiple nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). *Cytogenetics and Cell Genetics*. 69: 18-26.
- Schmid, M., Nanda I., Steinlein, C., Kausch, K., Epplen, J. y Haaf, T. 1991. Sex-Determining mechanisms and sex chromosomes in Amphibia. En: *Amphibian cytogenetics and evolution*. Chapter 11. (Green, D. y Sessions, S.) pp 393-431. Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, San Diego, USA.
- Schmid, M., Steinlein, C. y Feichtinger, W. 1989. Chromosome banding in Amphibia XIV. The karyotype of *Centrolenella antisthenesi* (Anura, Centrolenidae). *Chromosoma* 97: 434-438.

Targueta, C., Rivera, M., Souza, M., Recco-Pimentel S., y Lourenço, L. 2010.

Cytogenetic contribution for study of the Amazonian *Engystomops* (Anura; Leiperidae) assessed in the light of phylogenetic relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 54: 709-725.

Veiga-Menoncello, A., Lima, A., y Recco-Pimentel, S. 2003. Cytogenetic analysis of four central Amazonian species of *Colostethus* (Anura – Dendrobatidae) with a diploid complement of 22 chromosomes. *Hereditas* 139: 189–198.

White, M. 1978. *Modes of Speciation*. W.H. Freeman and Company, San Francisco, USA.

Zeiss, C. 2005. Axio Vision 4.4 Software. Altötting, Alemania.

10. FIGURAS

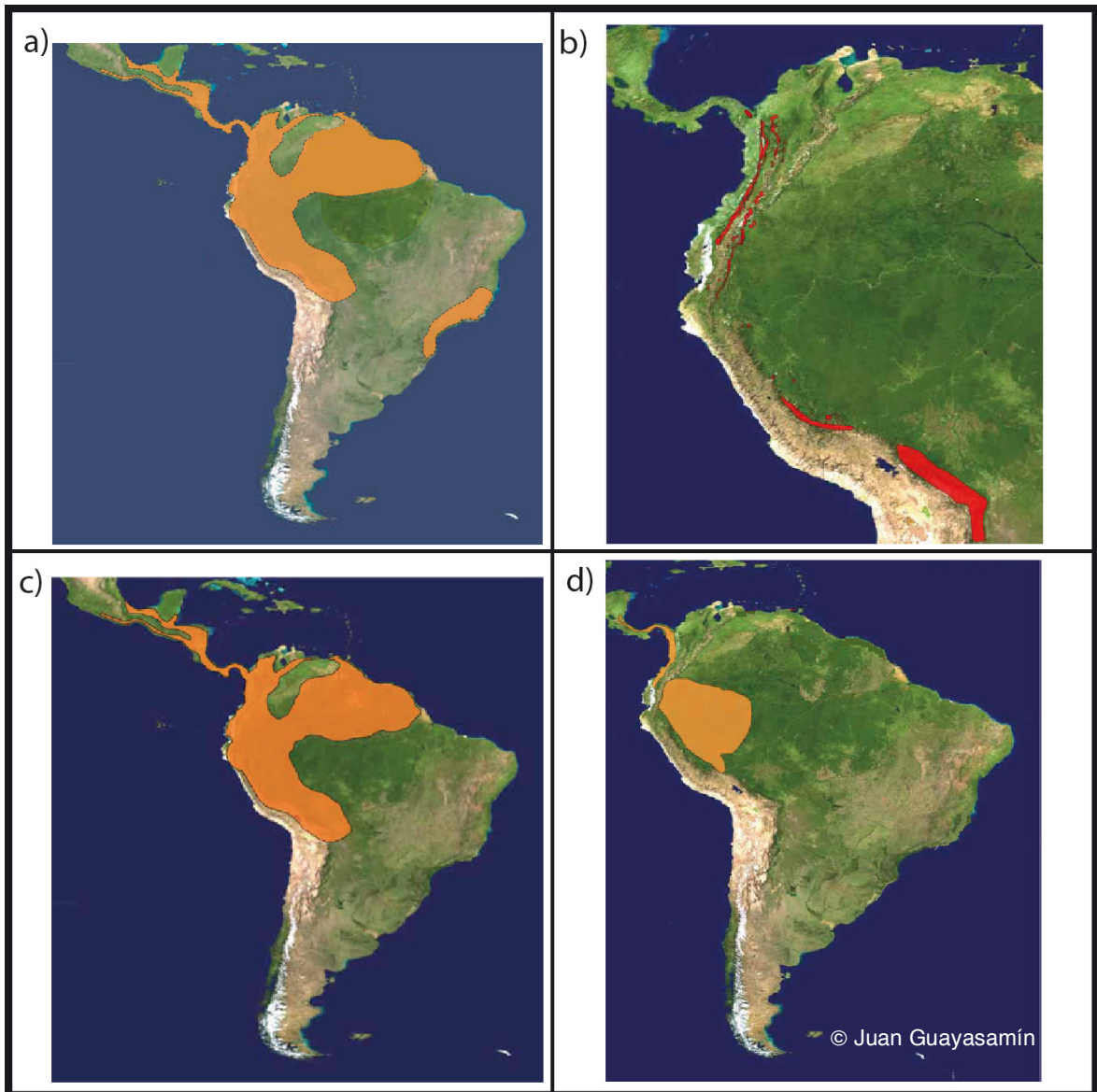


Figura 1. Mapa de Distribución de: a) Familia Centrolenidae b) Género *Nymphargus* c) Género *Hyalinobatrachium* d) Género *Teratohyla*.

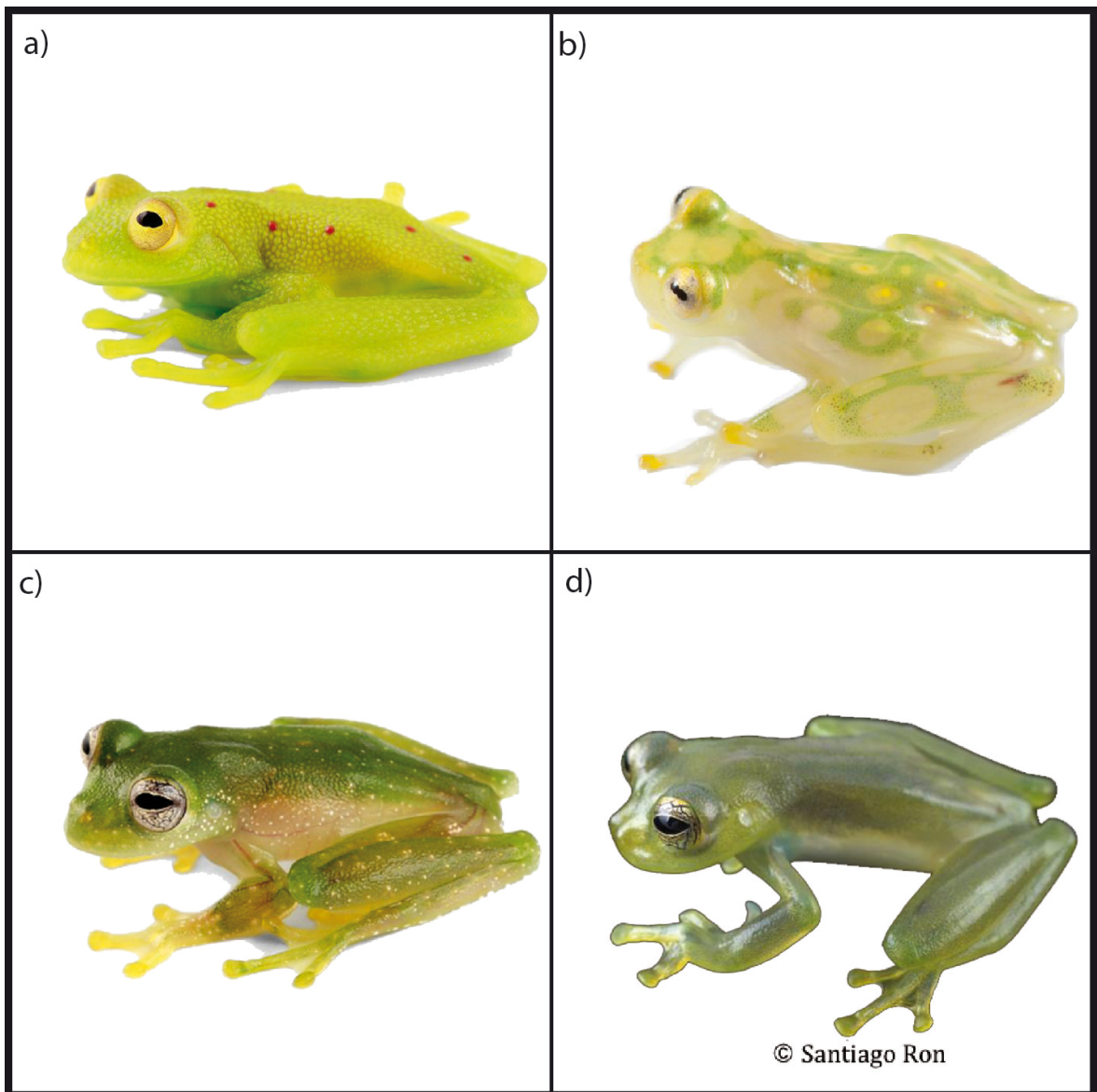


Figura 2. Especies de Centrolenidae analizadas: a) *Nymphargus grandisonae* b) *Hyalinobatrachium aureoguttatum* c) *Teratohyla pulverata* d) *Teratohyla spinosa*

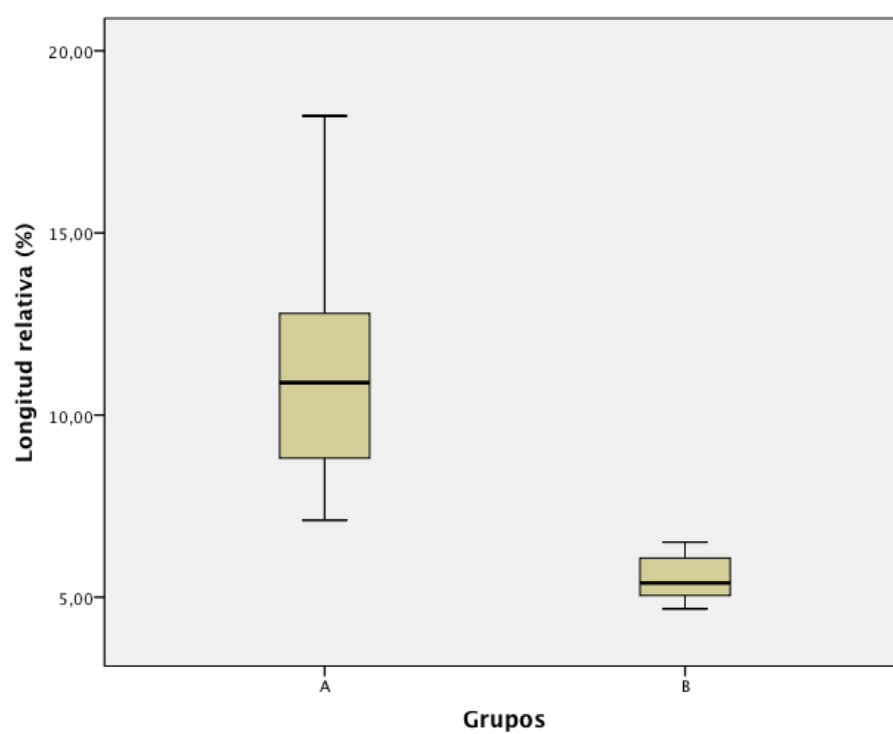


Figura 3. Diagrama de cajas de *Teratohyla pulverata*.

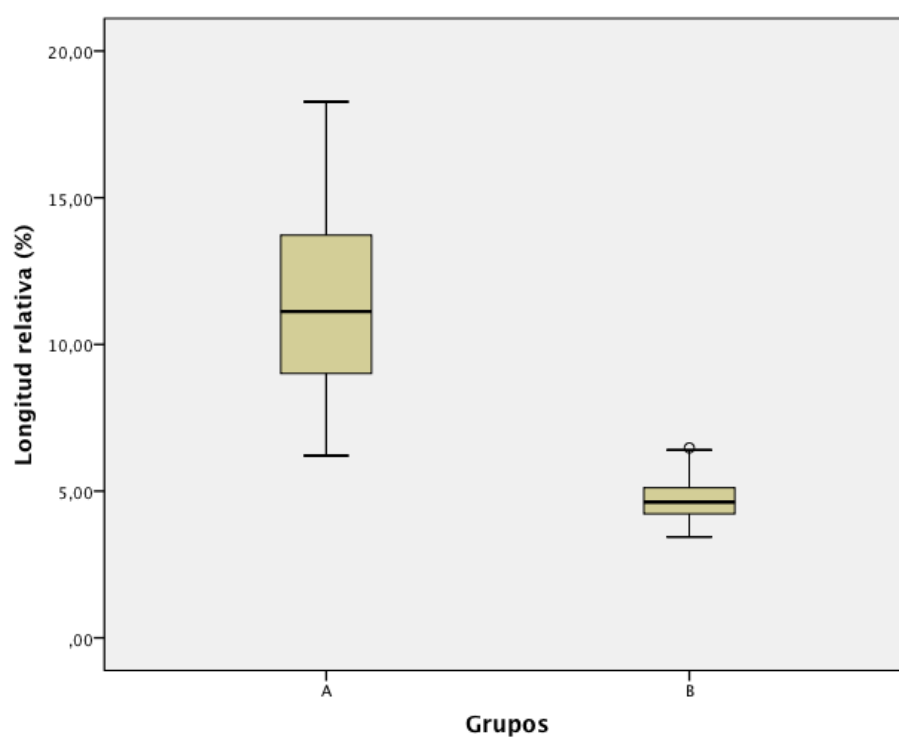


Figura 4. Diagrama de cajas de *Teratohyla spinosa*.

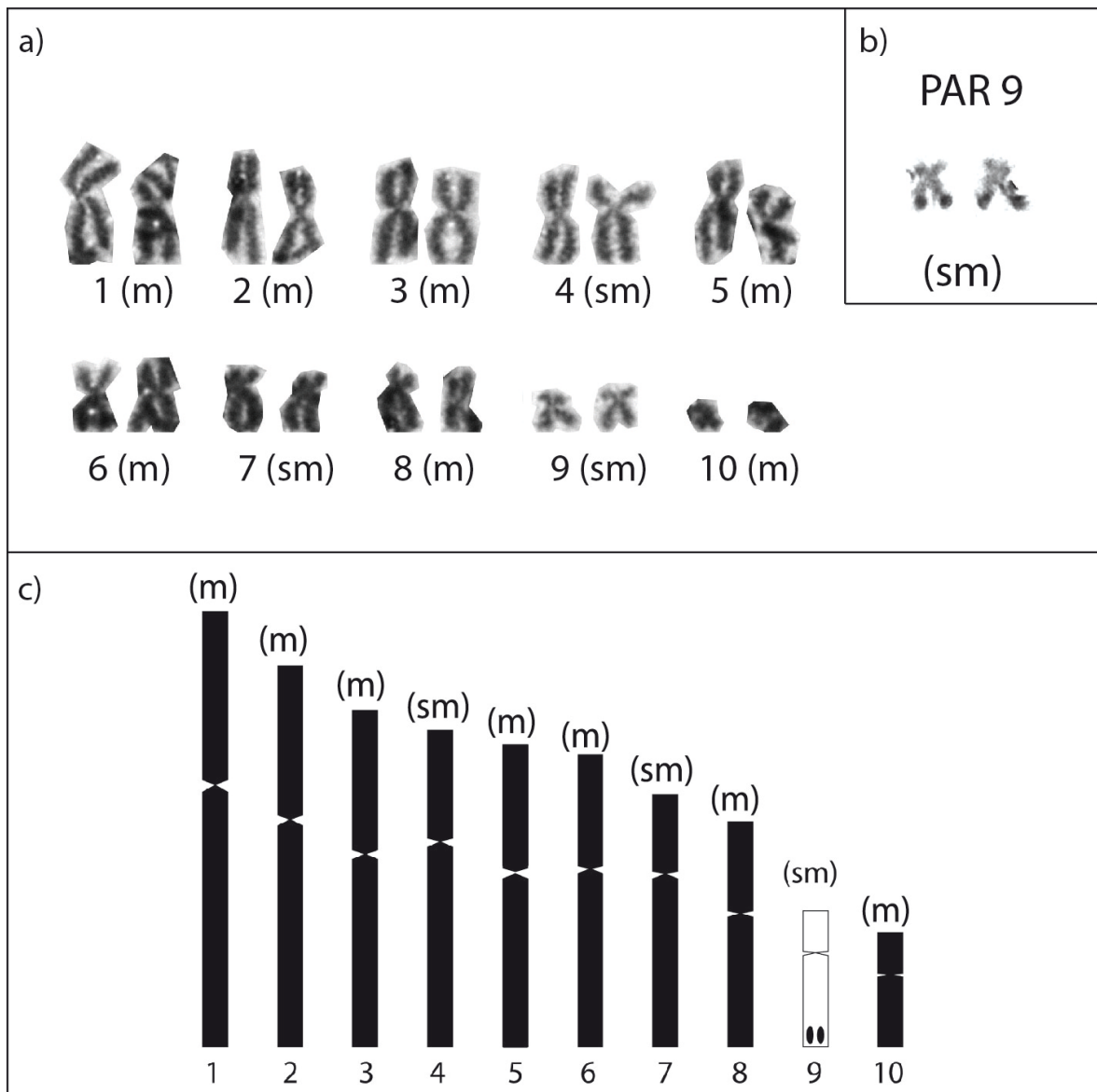


Figura 5. *Nymphargus grandisonae*. a) Cariotipo en el que se incluye la morfología cromosómica b) Banda NOR del par cromosómico 9; c) Ideograma (el par 9 de color blanco posee el NOR y los óvalos indican su ubicación).

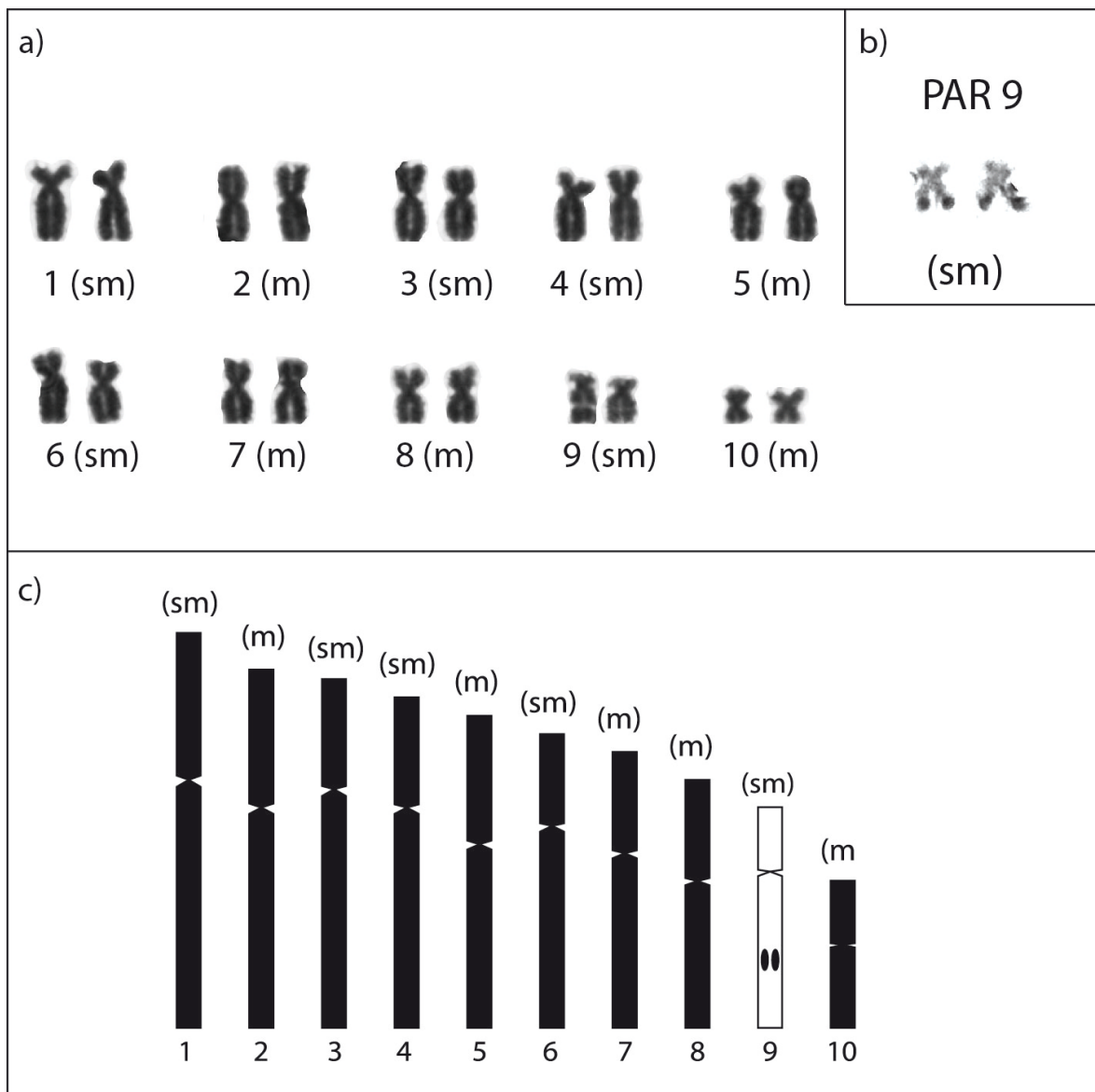


Figura 6. *Hyalinobatrachium aureoguttatum*. a) Cariotipo en el que se incluye la morfología cromosómica b) Banda NOR del par cromosómico 9; c) Ideograma (el par 9 de color blanco posee el NOR y los óvalos indican su ubicación).

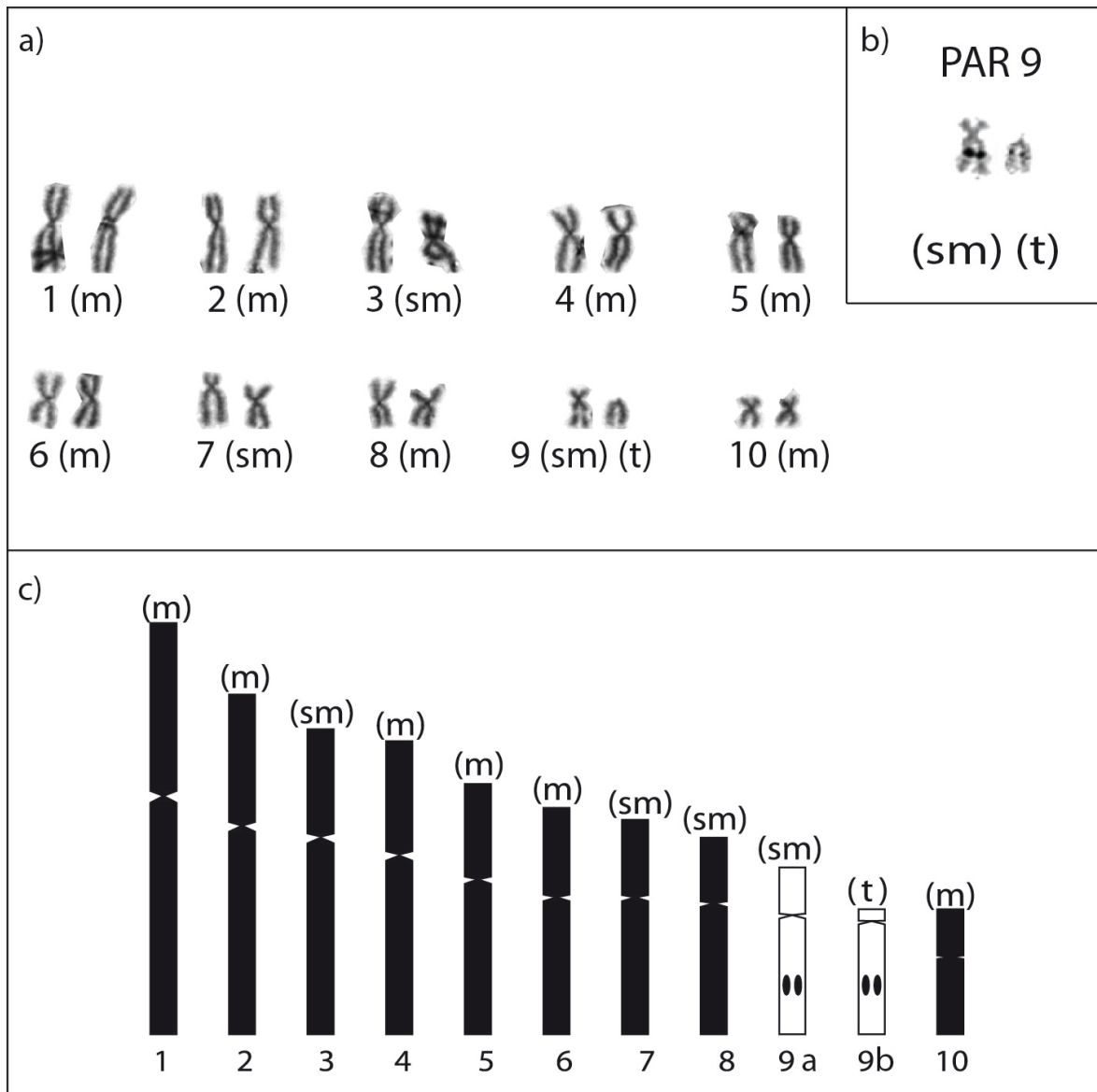


Figura 7. *Teratohyla pulverata*. a) Cariotipo en el que se incluye la morfología cromosómica; b) Pareja y ubicación de la banda NOR; c) Ideograma (el par 9a y 9b de color blanco posee el NOR y los óvalos indican su ubicación). Nótese la diferencia en morfología y tamaño de miembros de este par.

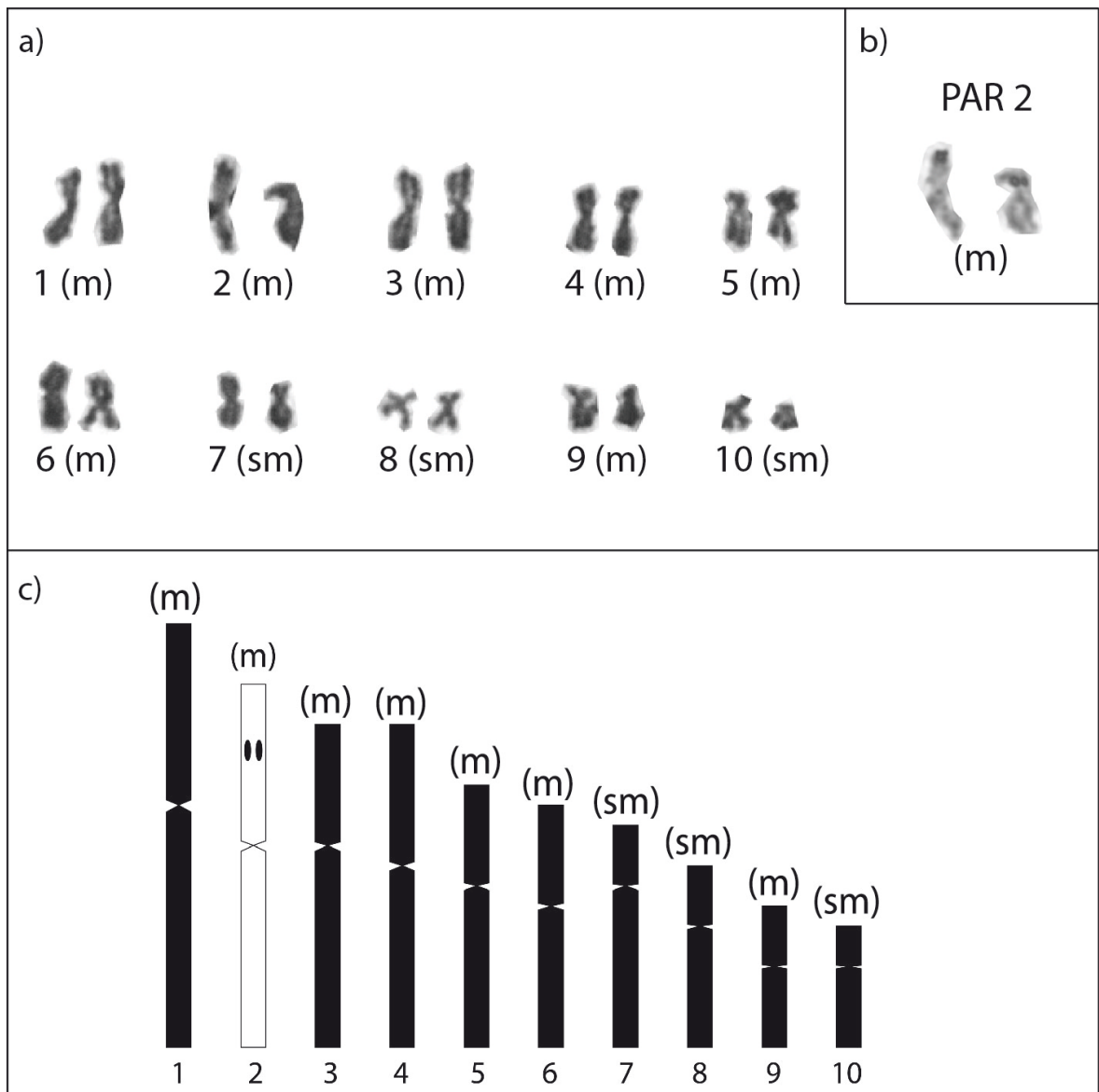


Figura 8. *Teratohyla spinosa*. a) Cariotipo en el que se incluye la morfología cromosómica b) Banda NOR del par cromosómico 9; c) Ideograma (el par 2 de color blanco posee el NOR y los óvalos indican su ubicación).

10. TABLAS

Tabla 1. Número de serie, sexo y localidad de los especímenes de la familia

Centrolenidae colectados para la investigación.

Especie	Serie	Sexo	Localidad	Provincia
<i>Nymphargus grandisonae</i>	QCAZ47983	ND	Chilma Bajo	Carchi
	QCAZ48011	M	Chilma Bajo	Carchi
	QCAZ39966	M	Chilma Bajo	Carchi
	QCAZ39969	M	Chilma Bajo	Carchi
	QCAZ40178	M	Chilma Bajo	Carchi
	QCAZ39980	M	Chilma Bajo	Carchi
<i>Hyalinobatrachium aureoguttatum</i>	QCAZ45364	M	Durango	Esmeraldas
	QCAZ45366	ND	Durango	Esmeraldas
	QCAZ45367	ND	Durango	Esmeraldas
	QCAZ45368	M	Durango	Esmeraldas
	QCAZ45370	M	Durango	Esmeraldas
<i>Teratohyla spinosa</i>	QCAZ45410	M	Durango	Esmeraldas
	QCAZ45411	F	Durango	Esmeraldas
<i>Teratohyla pulverata</i>	QCAZ45414	M	Durango	Esmeraldas

ND: No Determinado, M: Masculino, F: Femenino

Tabla 2. Prueba de muestras independientes para *Nymphargus grandisonae*.

Prueba de muestras independientes									
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas			Prueba T para la igualdad de medias				
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilate- ral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia Inferior Superior
Tamaño	Se han asumido varianzas iguales	15,780	,000	10,860	58	,000	6,69544	,61651	5,46136 7,92952
	No se han asumido varianzas iguales			20,592	56,21	,000	6,69544	,32515	6,04415 7,34673

Tabla 3. ANOVA de un factor para *Hyalinobatrachium aureoguttatum*.

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	173,608	1	173,608	75,021	,000
Intra-grupos	111,079	48	2,314		
Total	284,687	49			

Tabla 4. Valores promedio de las longitudes relativas y desviaciones estándar de los cromosomas mitóticos de cuatro especies de centrolenidos.

Especie	Par cromosómico					
	1	2	3	4	5	6
<i>Nymphargus grandisonae</i>	15,22 ± 0,33	13,25 ± 0,45	12,12 ± 0,41	11,40 ± 0,44	10,71 ± 0,70	10,45 ± 0,36
<i>Hyalinobatrachium aureoguttatum</i>	13,34 ± 0,44	12,15 ± 0,26	12,07 ± 0,35	11,28 ± 0,35	10,80 ± 0,22	10,02 ± 0,40
<i>Teratohyla pulverata</i>	16,47 ± 1,35	13,35 ± 0,62	12,06 ± 0,95	11,56 ± 0,34	10,14 ± 0,82	8,96 ± 0,43
<i>Teratohyla spinosa</i>	15,98 ± 1,29	13,95 ± 0,51	12,97 ± 1,04	11,88 ± 0,67	10,54 ± 0,55	9,23 ± 0,80

Continuación tabla 4

Especie	Par cromosómico			
	7	8	9	10
<i>Nymphargus grandisonae</i>	8,92 ± 0,35	8,64 ± 0,52	4,88 ± 0,29	4,41 ± 0,35
<i>Hyalinobatrachium aureoguttatum</i>	9,34 ± 0,75	8,46 ± 0,78	7,37 ± 0,36	5,17 ± 0,20
<i>Teratohyla pulverata</i>	8,57 ± 0,91	7,84 ± 0,50	5,75 ± 0,64 6,62 ± 1,44	5,31 ± 0,60 4,94 ± 0,35
<i>Teratohyla spinosa</i>	8,62 ± 0,68	7,35 ± 0,68	5,05 ± 0,58	4,44 ± 0,68

Se resalta con amarillo la existencia de una probable translocación del cromosoma 1 al 9 en *H. aureoguttatum*.
Se resalta con turquesa la diferencia en las longitudes relativas de los cromosomas heteromórficos del par 9.

Tabla 5. Prueba de homogeneidad de varianzas para *Nymphargus grandisonae*.

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
15,780	1	58	,000

Tabla 6. Prueba de homogeneidad de varianzas para *Hyalinobatrachium aureoguttatum*.

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,394	1	48	,533

Tabla 7. Comparación de la morfología de los cromosomas mitóticos de cinco especies de Centrolenidae.

Especie	Cromosoma									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Nymphargus grandisonae</i>	m	m	m	sm	m	m	sm	m	sm	m
<i>Hyalinobatrachium aureoguttatum</i>	sm	m	sm	sm	m	sm	m	m	sm	m
<i>Teratohyla pulverata</i>	m	m	sm	m	m	m	sm	sm	<div>9a 9b</div> <div>sm t</div>	m
<i>Teratohyla spinosa</i>	m	m	m	m	m	m	sm	sm	m	sm
<i>*Vitreorana antisthenesi</i>	m	m	m	sm	m	sm	m	m	sm	sm

*Datos reportados por Schmid *et al.* (1989).

El recuadro muestra la diferencia morfológica registrada en los miembros del par cromosómico 9.

m, metacéntrico; sm, submetacéntrico; t, telocéntrico.

11. ANEXOS

Anexo 1: Fórmulas para obtener Longitud relativa promedio, radio centromérico e índice centromérico.

$$LR = \frac{100 * Longitud\ cromosoma}{\Sigma\ (longitudes\ de\ todos\ cromomas\ de\ la\ metafase)}$$

$$RC = \frac{Longitud\ brazo\ q}{Longitud\ brazo\ p}$$

$$IC = \frac{Longitud\ brazo\ p}{Longitud\ brazo\ p + longitud\ brazo\ q}$$

Anexo 2: Datos cromosómicos de *Nymphargus grandisone*.

CROMOSOMA	p	q	LR	RC	IC	Morf (RC)	Morf (IC)
1	0,159	0,270	13,337	1,700	0,370	sm	sm
2	0,147	0,243	12,148	1,648	0,378	m	m
3	0,124	0,264	12,065	2,119	0,321	sm	sm
4	0,125	0,238	11,282	1,910	0,344	sm	sm
5	0,144	0,203	10,800	1,411	0,415	m	m
6	0,104	0,217	10,016	2,093	0,323	sm	sm
7	0,114	0,187	9,344	1,641	0,379	m	m
8	0,108	0,162	8,460	1,497	0,400	m	m
9	0,066	0,170	7,374	2,586	0,279	sm	sm
10	0,073	0,093	5,173	1,276	0,439	m	m

p, brazo corto; q, brazo largo; LR, longitud relativa; RC, radio centromérico; IC, índice centromérico; Morf, morfología; m, metacéntrico; sm, submetacéntrico

Anexo 3: Datos cromosómicos de *Hyalinobatrachium aureguttatum*.

CROMOSOMA	p	q	LR	RC	IC	Morf (RC)	Morf (IC)
1	0,697	1,055	15,215	1,514	0,398	m	m
2	0,623	0,919	13,252	1,477	0,404	m	m
3	0,582	0,782	12,122	1,343	0,427	m	m
4	0,448	0,825	11,400	1,843	0,352	sm	sm
5	0,460	0,720	10,708	1,567	0,390	m	m
6	0,499	0,703	10,449	1,410	0,415	m	m
7	0,319	0,700	8,925	2,192	0,313	sm	sm
8	0,368	0,540	8,641	1,468	0,405	m	m
9	0,171	0,380	4,876	2,224	0,310	sm	sm
10	0,175	0,289	4,411	1,655	0,377	m	m

p, brazo corto; q, brazo largo; LR, longitud relativa, RC, radio centromérico; IC, índice centromérico; Morf, morfología; m, metacéntrico; sm, submetacéntrico

Anexo 4: Datos cromosómicos de *Teratohyla pulverata*.

CROMOSOMA	p	q	LR	RC	IC	Morf (RC)	Morf (IC)
1	0,294	0,402	16,473	1,366	0,423	m	m
2	0,216	0,346	13,345	1,604	0,384	m	m
3	0,177	0,323	12,059	1,824	0,354	sm	sm
4	0,196	0,292	11,560	1,491	0,401	m	m
5	0,157	0,264	10,144	1,681	0,373	sm	sm
6	0,164	0,216	8,958	1,319	0,431	m	m
7	0,121	0,244	8,570	2,014	0,332	sm	sm
8	0,108	0,222	7,839	2,046	0,328	sm	sm
9	0,058	0,182	5,747	3,157	0,241	sm-t	st
10	0,086	0,137	5,306	1,601	0,385	m	m

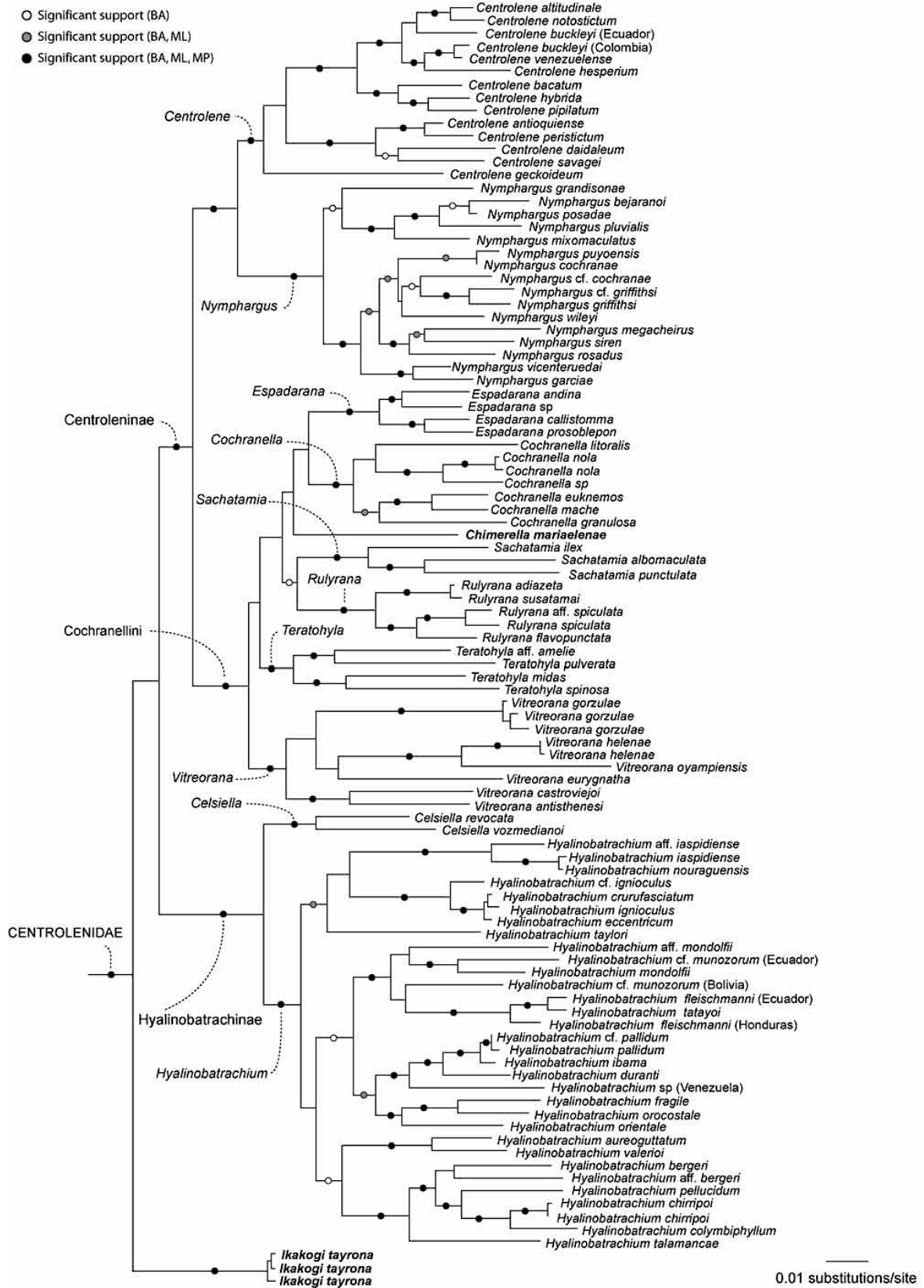
p, brazo corto; q, brazo largo; LR, longitud relativa, RC, radio centromérico; IC, índice centromérico; Morf, morfología; m, metacéntrico; sm, submetacéntrico; t, telocéntrico

Anexo 5: Datos cromosómicos de *Teratohyla spinosa*.

CROMOSOMA	p	q	LR	RC	IC	Morf (RC)	Morf (IC)
1	0,697	1,055	15,215	1,514	0,398	m	m
2	0,623	0,919	13,252	1,477	0,404	m	m
3	0,582	0,782	12,122	1,343	0,427	m	m
4	0,448	0,825	11,400	1,843	0,352	sm	sm
5	0,460	0,720	10,708	1,567	0,390	m	m
6	0,499	0,703	10,449	1,410	0,415	m	m
7	0,319	0,700	8,925	2,192	0,313	sm	sm
8	0,368	0,540	8,641	1,468	0,405	m	m
9	0,171	0,380	4,876	2,224	0,310	sm	sm
10	0,175	0,289	4,411	1,655	0,377	m	m

p, brazo corto; q, brazo largo; LR, longitud relativa, RC, radio centromérico; IC, índice centromérico; Morf, morfología; m, metacéntrico; sm, submetacéntrico

Anexo 5. Foto de la filogenia de la familia Centrolenidae



Tomada del artículo: Guayasamín *et. al.*, 2009.

ANEXO 7. Foto de los cromosomas de *Vitreorana antisthenesi*.

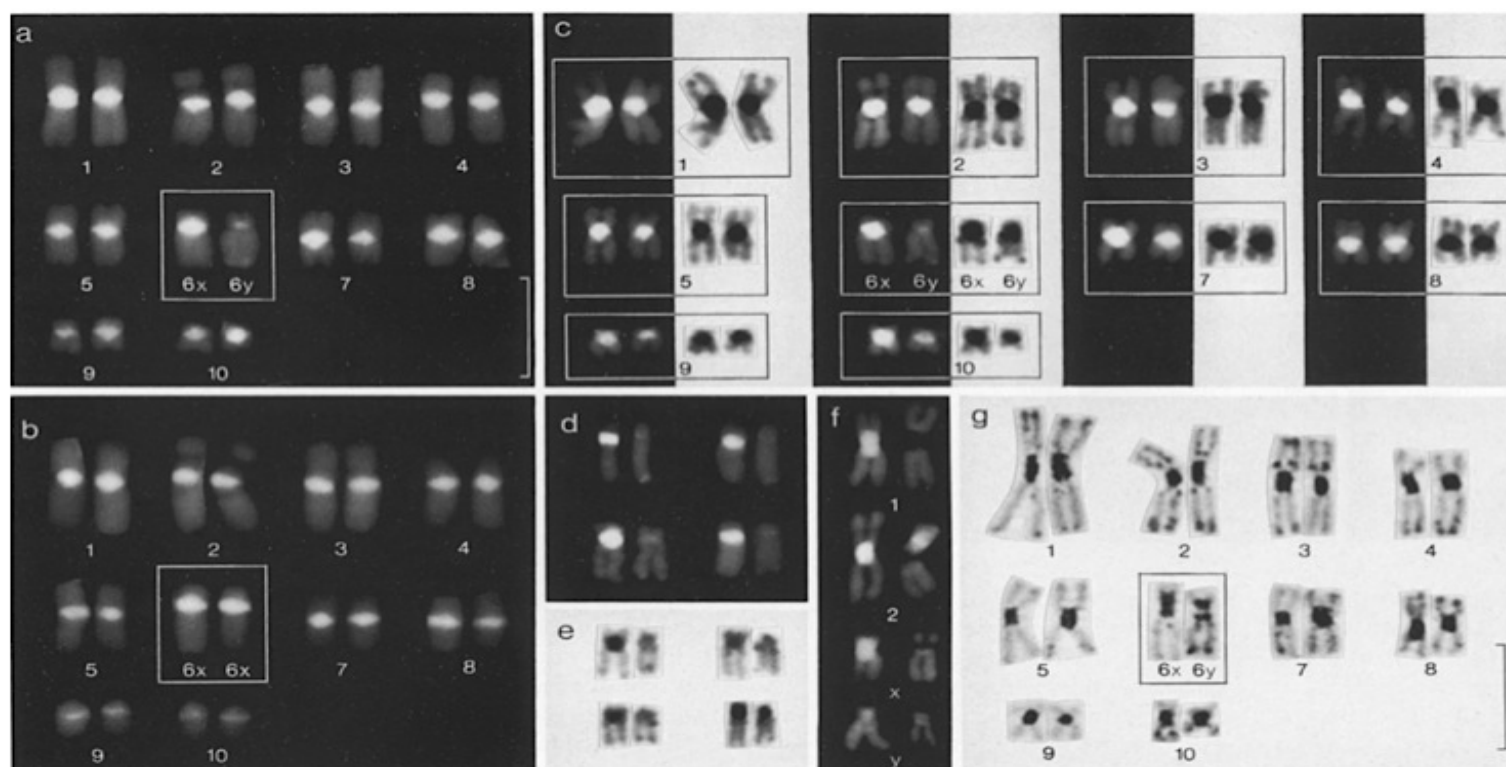


Fig. 1. a, b Quinacrone-stained karyotypes from bone marrow of male (a) and female (b) *Centrolenella antisthenesi*. The XY/XX sex chromosomes nos. 6 are framed. Large amounts of brightly fluorescing constitutive heterochromatin are located in the centromeric and pericentromeric regions of all autosomes and the X chromosome, whereas in the Y chromosome quinacrone-positive fluorescence is restricted to small bands at the centromere and the long arm telomeres. c Male karyotype prestained with quinacrone (left) and subsequently C-banded (right). Note that all the C-band-positive pericentromeric heterochromatin of the Y chromosome is quinacrone negative. d, e Selected examples of quinacrone-stained (d) and C-banded (e) XY sex chromosome pairs. f Chromosomes nos. 1, 2, X and Y after staining with DAPI (left) and distamycin A/mithramycin (right) showing complementary banding patterns. Note the bright mithramycin labeling of the nucleolus organizer region in the short arm of chromosome no. 2. g C-banded male karyotype from intestine with interstitially and telomerically located heterochromatic bands. Bars represent 10 μ m

Tomada de Schmid *et. al.*, 1989.